

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL



PAPEL DA COAGULAÇÃO NA RESPOSTA DO MOSQUITO
***ANOPHELES GAMBIAE* AO PARASITA DA MALÁRIA**
PLASMODIUM BERGHEI

ADILSON JOSÉ DE PINA

MESTRADO EM BIOLOGIA HUMANA E AMBIENTE

2008

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL



**PAPEL DA COAGULAÇÃO NA RESPOSTA DO MOSQUITO
ANOPHELES GAMBIAE AO PARASITA DA MALÁRIA
*PLASMODIUM BERGHEI***

ADILSON JOSÉ DE PINA

MESTRADO EM BIOLOGIA HUMANA E AMBIENTE

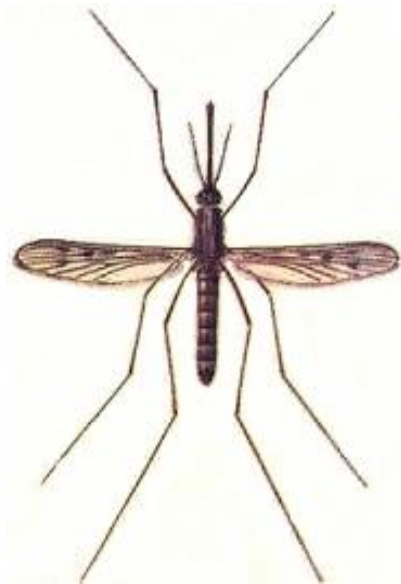
2008

Orientação:

Professor Doutor Henrique Silveira, Centro de Malária e outras Doenças Tropicais, Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa (CMDT-LA IHMT, UNL)

Professora Doutora Maria Teresa Ferreira Ramos Nabais Oliveira Rebelo
Departamento de Biologia Animal (DBA) - FCUL

Trabalho realizado no Centro de Malária e outras Doenças Tropicais, UEI Malária,
Instituto de Higiene e Medicina Tropical



“Se quisesse ver toda a Natureza reunida num único lugar, em todo o seu encanto, em toda a sua habilidade, em toda a sua capacidade de provocar a morte e em toda a sua sexualidade, onde encontraria um símbolo mais perfeito que no mosquito?”

Spielman and D'Antonio, 2004

Aos meus pais e irmãos...
... por tudo!

AGRADECIMENTOS:

A realização desta tese foi, sem dúvida, uma tarefa árdua e estimulante e, ao mesmo tempo, um trabalho de parcerias, possível graças ao apoio de um conjunto de pessoas às quais ligam laços profissionais, parentesco, e/ou de amizade. Pessoas às quais, queria expressar a minha sincera gratidão:

- Ao Professor Doutor Henrique Silveira, meu orientador, por ter proposto e aceite a realização deste trabalho no CMDT. Pela inesgotável paciência, atenção e disponibilidade dispensado ao longo do projecto. Pela objectividade e rigor científico no esclarecimento das minhas dúvidas. Enfim, por todo o esforço e atenção dispensada. Um muito Obrigado!

- Á professora Deodália Dias, coordenadora do II mestrado em Biologia Humana e Ambiente da FCUL, por ter aceite a minha candidatura a este mestrado, por estar sempre disponível a qualquer dúvida e por ter proporcionado a realização deste trabalho no CMDT.

- Á professora Doutora Teresa Rebelo, minha orientadora interna na FCUL, pela preocupação e pelo acompanhamento no desenrolar deste trabalho. Pela ajuda disponibilizada, pelo apoio na correcção da tese, e por tudo.

- Aos meus pais, José de Pina e Antónia de Pina. Por serem meus pais, pela confiança e pelo carinho. Apesar da distância e das imensas saudades, estiveram sempre presentes. Pelo ajuda, pela compreensão, por terem apostado na minha educação e por terem ajudado nos momentos mais difíceis. Pelo sacrifício que continuam a fazer pelos filhos e acima de tudo pelo amor.

- Ao Professor Doutor Virgílio do Rosário, Director da UEI Malária/CMDT por ter providenciado as condições laboratoriais e logísticas necessárias para o meu trabalho.

- Aos meus irmãos, José António, Adriano, Carlos e Rútiisson, que apesar de ausentes, confiaram sempre no irmão mais novo. Pela força, e pelo orgulho que sempre depositaram em mim. Espero um dia poder retribuir todo o apoio dado.

- Ao pessoal do CMDT, especialmente ao Filipe Lopes, Susana Ramos, Rute Félix, Catarina Alves, Joana Alves, Zoraima Neto, Cristina Mendes, José Luís Vicente e todo o resto do pessoal, pela ajuda, pela atenção dispensada e pelos momentos

passados juntos, o que facilitou o trabalho. Um muito obrigado por estarem sempre disponíveis para o esclarecimento de qualquer dúvida e pela paciência.

- Aos inúmeros colegas e estudantes cabo-verdianos nos estrangeiros, especialmente os que se encontram aqui em Portugal e ao pessoal da FCUL: Zenaida Costa, Osvaldo Ortet, Eloisa Marques, Lígia Delgado, Raquel Delgado, Flávio Tomás, João Evandro, Kleine Cardoso, Emília Vieira, Elisângela Silva, Tavi e a todos os outros colegas e amigos a quem tive a oportunidade de conhecer e relacionar durante o meu percurso académico. Obrigado pela força, pelo acompanhamento, pela amizade e o companheirismo, e por conseguiram preencher a falta e a saudade dos familiares em Cabo Verde. Por terem dado um voto de confiança e pela ajuda. Um obrigado á colega Vânia Teófilo, por estarmos juntos neste desafio desde o início. Pelo apoio dado desde a entrada na FCUL, pela presença amiga e por toda a ajuda dada no CMDT.

- Aos meus grandes Hernany Monteiro, Flávio Pina, Emanuel Cardoso, Leandro Pina, Gilson Frede, Maiky Pires, Lídia Santos, e Ângela que apesar da distância, souberam dar o maior contributo durante o meu percurso académico. Um obrigado pela amizade, pela força e pelo carinho. Ao colega Nilton Tavares, pelo apoio, pela presença amiga e por tudo o que tem feito para me ajudar.

- Aos meus tios, aos meus avôs, aos meus primos em Portugal e Cabo Verde, em especial á Isa Maria, Monalisa Gomes, Jailson Fernandes, Mariozé, Jéssica e Beatriz, Elvis e Elton, em particular ao António Jandir, primo e amigo. Pela amizade, pelo apoio e pelo companheirismo.

- Á “mana” Helena Monteiro, sobrinho Marcelo, ao Vindo, pelo apoio dado durante este último ano, pela amizade e pela confiança.

- Ao pessoal do “Tô na Onda”, pela amizade, pela facilidade proporcionada e pela confiança. Em especial as meninas Ana Mafalda, Regina Mariza e Marcelina Jamssens, pela compreensão e pela amizade.

- Ao governo de Cabo Verde, por ter financiado a minha licenciatura, o que me facultou a possibilidade de entrar neste mestrado e realizar o meu sonho.

- Aos alunos, professores e coordenadores dos workshops realizados no âmbito da Plataforma Ibérica da Malária em Lisboa e Madrid, pelos bons momentos passados, pela convivência e sobretudo pela amizade.

- A todos aqueles que de uma forma ou outra, apoiaram desde o início do meu percurso académico, nomeadamente à Professora Goreth Pires que me ensinou a gostar de Biologia, ao professor Luís Pires e a todos os outros meus professores que me ensinaram me acompanharam desde o ensino secundário até hoje. Pela força e pelo apoio. A todos os que deram a sua contribuição durante este tempo e estiveram sempre presentes. Obrigado pela amizade, pela força e pela confiança.

Índice

Página

Agradecimentos	i
Índices	iv
Índice das tabelas.....	vii
Índice das figuras.....	viii
Abreviaturas	x
Resumo.....	xii
Abstract	xiv

I - Introdução

1.1 - Malária	2
1.1.2- Problemática da malária	2
1.1.3 - Ciclo de vida do Parasita	4
1.1.4 - O Vector	6
1.2 – Imunidade	6
1.2.1 - O Reconhecimento do Não-Próprio (Nonself)	9
1.2.2 - Em <i>Anopheles gambiae</i>	12
1.3 – Coagulação.....	15
1.4 – Transglutaminase.....	16
1.5 – Objectivos.....	19

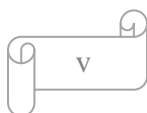
II – Materiais e Métodos

2.1- Produção e manutenção dos mosquitos	21
2.2 – Caracterização da transglutaminase de <i>Anopheles gambiae</i>	21
2.2-1 Extracção de DNA.....	22
2.2.2 – PCR	23
2.2.3- Electroforese.....	25
2.2.4 - Purificação do produto de PCR.....	25
2.2.5- Quantificação	25
2.2.6- Sequenciação.....	26

2.2.7- Extracção de RNA	26
2.2.8- Síntese de cDNA.....	27
2.2.9 PCR.....	27
2.3 - Caracterização do papel da transglutaminase durante a infecção por <i>Plasmodium berghei</i>	29
2.3.1 – Infecções experimentais	29
2.3.2 – Efeito da inibição química das Transglutaminases do mosquito durante a infecção por <i>Plasmodium berghei</i>	30
2.3.3 – Efeito do silenciamento dos genes que codificam para a Transglutaminase AGAP009097 e AGAP009098 durante a infecção por <i>Plasmodium berghei</i>	30
2.3.3.1 – Síntese de RNA de cadeia dupla (dsRNA).....	30
2.3.3.2 - Silenciamento dos Genes AGAP009097 e AGAP009098.....	31
2.3.3.3 – Infecção dos mosquitos com <i>P. berghei</i>	32
2.3.3.4 – Perfil de transcrição dos genes AGAP97 e AGAP98 durante a infecção por <i>Plasmodium berghei</i>	32
2.3.3.5 - Extracção de RNA.....	33
2.3.3.6- RT-PCR em tempo real	33
2.3.3.7 – Construção da curva-padrão.....	33
2.3.3.8 – Condições da reacção de PCR em tempo real.....	34
2.3.4 – Análise estatística.....	34

III – Resultados

3.1 - Caracterização dos genes que codificam transglutaminases	36
3.2 - Caracterização do papel da enzima da transglutaminase durante a infecção com <i>Plasmodium berghei</i>	38
3.2.1- Caracterização da expressão das transglutaminases AGAP009097 e AGAP009098 no estômago e corpo gordo.....	38
3.2.2 - Efeito da inibição de Transglutaminase durante a infecção de <i>Plasmodium berghei</i> em <i>Anopheles stephensi</i>	41
3.2.3 - Silenciação do gene usando dsRNA	43



IV - Discussão

4.1- Caracterização dos genes que codificam transglutaminases.....	47
4.2- Caracterização do papel da enzima da transglutaminase durante a infecção com <i>Plasmodium berghei</i>	48

V - Conclusão.....	51
---------------------------	-----------

VI - Bibliografia	52
--------------------------------	-----------

VII - Anexo I

Sequências dos genes AGAP009097 e AGAP009098 da Transglutaminase.....	61
-----------------------------------------------------------------------	----

VIII – Anexo II

Tabelas de análise estatística dos dados da inibição e silenciamento dos genes AGAP009097 e AGAP009098.....	64
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

Índice das Tabelas

II – Materiais e Métodos

Tabela 1 – Sequência dos primers utilizados para a sequenciação dos genes AGAP009097 e AGAP009098.....	23
Tabela 2 – Combinação de primers utilizados nas várias misturas de reacção da PCR e posterior sequenciação dos genes.....	24
Tabela 3 – Combinações primers utilizados para a reacção de PCR com o cDNA...27	
Tabela 4 – Combinação dos vários primers utilizados nas várias misturas de reacção da PCR e posterior síntese de dsRNA.....	30

III – Resultados

Tabela 5 - Taxa de infecção determinada em mosquitos <i>A. gambiae</i> alimentados em murganhos infectados com <i>P. berghei</i>	38
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

VIII – Anexo II

Tabela 6 - Efeito da inibição de Transglutaminase durante a infecção de <i>Plasmodium berghei</i> em <i>Anopheles stephensi</i>	65
Tabela 7 - Efeito do silenciamento de Transglutaminase durante a infecção de <i>Plasmodiumberghei</i> em <i>Anopheles gambiae</i>	66

Índice de Figuras:

I – Introdução

Fig. 1 - Ciclo de vida do parasita da Malária, <i>Plasmodium sp.</i> , indicando as diferentes fases no hospedeiro vertebrado – homem e no invertebrado – mosquito.....	5
Fig. 2 - Modelo da resposta imune dos insectos.....	8
Fig. 3 – Modelos das reacções defensivas na activação dos hemócitos.....	11
Fig. 4 – Genes que controlam a intensidade da infecção	14

II – Materiais e Métodos

Fig. 5 – Representação esquemática dos cromossomas do mosquito <i>Anopheles gambiae</i> e localização dos genes AGAP009097 e AGAP009098.....	22
Fig. 6 – Esquema da localização genómica dos locais de amplificação obtidos com os pares de primers.....	24
Fig. 7 – Esquema da localização cromossómica dos locais de amplificação obtidos com os pares de primers.....	28

III- Resultados

Fig. 8 - Exemplo de uma electroforese dos produtos de PCR obtidos com as diferentes combinações de primers utilizados na caracterização dos genes AGAP009097 e AGAP009098.....	36
Fig. 9 - Exemplo dos polimorfismos detectadas nas sequências obtidas das amostras de gDNA de <i>A. gambiae</i> Yoaundé.....	37
Fig. 10 - Alinhamento das sequências obtidas com a mistura de reacção (D).....	37
Fig. 11 – Gráfico dos resultados da amplificação por RT-PCR em tempo real da curva padrão.....	40

Fig. 12 – Exemplo das curvas de dissociação dos produtos amplificados para o gene S7, gene utilizado como referência para normalização dos dados.....	40
Fig. 13 – Aumento relativo do valor médio da expressão do gene AGAP009098 no intestino médio e corpo gordo de mosquitos alimentados em murganhos infectados em comparação com os alimentados em não infectados.....	41
Fig. 14 – Análise das taxas de infecção <i>A. stephensi</i> com <i>P. berghei</i>	42
Fig. 15 - Intensidade de infecção de <i>A. stephensi</i> com <i>P. berghei</i>	43
Fig. 16 - Análise das taxas a infecção de <i>P. berghei</i> em mosquito tratados com dsRNA para os genes AGAP009097 e AGAP009098.....	44
Fig. 17 - Análise da intensidade de infecção de <i>P. berghei</i> em mosquito tratados com dsRNA para os genes AGAP009097 e AGAP009098.....	45

VII- Anexo I

Fig. 18 - Resultados da sequenciação do gene AGAP009097	62
Fig. 19 - Resultados da sequenciação do gene AGAP009098	63

Lista de Abreviaturas

µg – micrograma

µl – microlitro

A – Adenina

AMP - Péptido antimicrobiano

ATP – Adenosina Trifosfato

C – Citosina

cDNA – Ácido desoxirribonucleico complementar

CE – Envelope celular

CEC – Cecropina

CLIP – Proteases serinicas com domínio CLIP

CMDT - Centro de Malária e outras Doenças Tropicais

CTL – Lectina do tipo C

CTLGA - *CTLs* que se ligam a galactose

CTLMA - *CTLs* que se ligam a manose

CTLSE - *CTLs* que se ligam a selectinas

DBA – Departamento de Biologia Animal

DEF – Defensina

DEPC – Dietilpirocarbonato

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DNase – Deoxiribonuclease I

dNTP – 3'- deoxinucleico – 5'- trifosfato

dsRNA - *double-stranded RNA*

FCUL – Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa

G – Guanina

GAM – Gambicina

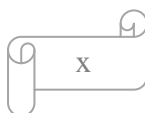
GNBP - proteínas de ligação às bactérias Gram-negativas

HPM – Homem-*Plasmodium*-Mosquito

IHMT – Instituto de Higiene e Medicina Tropical

LPS - Lipopolissacarídeos

LRIMs - Proteínas imunes ricas em leucina



mg – miligrama
ml – mililitro
mRNA – Ácido desoxirribonucleico mensageiro
nM – Nanomolar
OMS – Organização Mundial da Saúde
PABA - ácido paraminobenzóico
PAMP - Padrões moleculares associadas aos patogénios
pb – pares de bases
PBS – *Phosphate buffered saline*
PCR – Reacção de polimerização em cadeia (*Polymerase Chain Reaction*)
PGRPs - Proteínas de reconhecimento de peptidoglicanos
PM – Membrana Peritrófica
PO - Fenoloxidase
PPAE – Enzimas activadoras da PPO
PPO - Pró-fenoloxidase
PRR – Receptores de reconhecimento de motivos estruturais conservados
RNA – Ácido Ribonucleico
RNAi – Ácido ribonucleico de interferência
rpm – rotações por minutos
RT – Transcrição reversa
RT-PCR – Reacção de polimerização em cadeia em tempo real
SRPN - serpinas
T – Timina
Taq DNA polimerase – DNA polimerase de *Thermus aquaticus*
TEP - Proteína contendo tioéster
TGase - Transglutaminase
U – Unidades
UNL – Universidade Nova de Lisboa
WHO - *World Health Organization*

Resumo

Malária é uma doença parasitária infecciosa aguda ou crónica, causada pelo protozoário do género *Plasmodium* que é transmitido ao homem através de picada de mosquitos fêmeas do género *Anopheles*. Causa a morte a milhões de pessoas por ano, na sua maioria crianças até aos 5 anos de idade. A inexistência de estratégias eficazes, contra a transmissão da malária, deve-se sobretudo à falta de conhecimento de moléculas cruciais ao desenvolvimento do parasita no vector. Mecanismos de reconhecimento do parasita e a resposta imune do mosquito à infecção são claramente alvos de novas estratégias de controlo da malária.

O ciclo natural de transmissão de *Plasmodium* requer a conclusão com sucesso, do ciclo esporogónico no intestino médio e nas glândulas salivares do mosquito *Anopheles*, um processo que demora cerca de duas semanas. Este processo de desenvolvimento pode ser bloqueado pelo sistema imune inato do mosquito, resultando assim na eliminação do parasita do vector. A resposta imunológica envolve vários mecanismos como a fagocitose, encapsulação, nodulação, síntese de péptidos antimicrobianos e coagulação, que são acompanhadas pela activação proteolítica da pró-fenoloxidase presente na hemolinfa.

O sistema imune é um factor determinante da capacidade vectorial do mosquito, pelo que vários estudos têm sido feitos para melhor compreender as respostas do mosquito *Anopheles*, principal vector da malária, ao parasita *Plasmodium*. Uma das principais respostas desencadeadas pelo sistema imune do mosquito é a coagulação. Estudos recentes demonstram que a coagulação da hemolinfa de *Anopheles* requer actividade da fenoloxidase e difere de *Drosophila s.p* na formação, estrutura e composição.

O objectivo deste trabalho é estudar o papel da coagulação na resposta do mosquito *Anopheles gambiae* ao parasita da malária *Plasmodium berghei*, através do estudo da transglutaminase. Para tal foi feita a caracterização dos genes que codificam para a transglutaminases em *A. gambiae*, através da sequenciação destes genes e dos seus transcritos, verificando-se alguns polimorfismos quando comparada com a sequência do genoma disponível na base de dados. Para caracterizar o papel desta enzima durante a infecção com *P. berghei*, foi feita a

inibição da actividade enzimática dos genes AGAP009097 e AGAP009098 que codificam para a transglutaminases. Foi feita a descrição da dinâmica de transcrição durante a infecção e o silenciamento destes mesmos genes usando dsRNA.

Observou-se um aumento da taxa de infecção e do número médio de oocistos por intestino médio nos mosquitos em que as transglutaminases foram inibidas quimicamente bem como naqueles que possuíam os genes silenciados, quando comparados com os grupos controlo.

Com este trabalho espera-se ter contribuído para uma melhor compreensão do funcionamento da capacidade imunológica dos mosquitos na resposta ao parasita da malária e a possibilidade de manipular o sistema imune dos mesmos de modo a eliminar o parasita e contribuir para a diminuição/irradicação da malária, uma das principais doença e causa de morte a nível mundial.

Palavras-chave: Malária, Sistema imune, Coagulação, Transglutaminase, *Anopheles gambiae*.

Abstract

Malaria is an infectious disease responsible for millions deaths per year and it affects mainly pregnant women and children under five living in sub- Saharan Africa. The disease is caused by protozoan parasites of the genus *Plasmodium* which are transmitted by female anopheles mosquitoes. Despite all the efforts that have been done, we still lack efficient strategies to combat the disease. There is a gap in our knowledge concerning the molecules which are essential for parasite development inside the mosquito vector. Understanding the mechanisms of immune response and parasite recognition in the mosquito vector are crucial for the development of new anti malarial strategies.

The natural cycle of *plasmodium* transmission requires the successful completion of the sporogonic cycle in the mid gut and the salivary glands of the *Anopheles* mosquito. This cycle lasts about two weeks and it can be blocked by the innate immune system of mosquito resulting in the elimination of the parasite. The immune response in the mosquito involves several mechanisms such as phagocytosis, encapsulation, nodulation, coagulation, and synthesis of anti-microbial peptides which is followed by the proteolytic activation of pro - phenoloxidase present in the hemolymph. The immune system plays a key role in the capacity vectorial of mosquitoes. Several studies have been conducted to better understand the mosquitoes immune system. It is now known that coagulation is a crucial mechanism of defense used by the mosquitoes immune system. Coagulation of the hemolymph requires the activity of the enzyme phenoloxidase which has at different form, structure and composition in *Drosophila s.p.*

The aim of this study is to understand the role of coagulation in the mosquito *Anopheles gambiae* in response to *Plasmodium berghei* infection, through the study of transglutaminases. The genes encoding the transglutaminases were sequenced, as well as its transcripts. Some polymorphisms were identified when we compared our sequences versus the described. To find out the function of the transglutaminases in *Anopheles gambiae* during *Plasmodium berghei* infection, an assay to inhibit enzyme activity was carried out, as well as silencing the genes AGAP009097 & AGAP009098 using double strand RNA (dsRNA).

The results showed that both gene silencing and transglutaminase inhibition resulted in an increase in the rate of infection and in the number of

oocysts per stomach analyzed. This work has contributed to our knowledge of the mosquitoes immune system in response to parasite infection and it showed that manipulation of the immune system of mosquitoes is possible, thus presenting a new strategy to combat malaria.

Key words: Malaria, immune system, coagulation, Transglutaminase, *Anopheles gambiae*.

I – INTRODUÇÃO

1.1 - Malária

A Malária é uma doença parasitária, endêmica em cerca de 109 países e territórios, sobretudo nas zonas tropicais e subtropicais, com intensidades de transmissão que varia de baixa a extremamente alta, (WHO 2008a). É transmitida ao homem por picadas de mosquitos fêmeas do género *Anopheles* infectados com *Plasmodium*. Existem cerca de 200 espécies do género *Plasmodium*, destas apenas 4 são capazes de infectar humanos: *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium vivax* e *Plasmodium falciparum*, sendo esta última a que provoca mais casos graves (Ayala et al., 1999; Chen et al., 2008).

Embora tenham sido desenvolvidos grandes esforços para combater a malária, actualmente, esta continua a provocar milhões de mortes por ano. Segundo o último relatório da OMS baseados em dados de 2006, regista-se entre 189 a 327 milhões de casos clínicos por ano e entre 801 000 a 1 212 000 mortos (WHO 2008b), 91% destes casos ocorrem em África, sobretudo em crianças com menos de 5 anos de idade e em mulheres grávidas (Lagerberg, 2008; Roca-Feltrer et al., 2008). É causa de 2,3% de doença a nível global e 9% em África, (Lagerberg, 2008) e estima-se que a nível mundial, cerca de 3,3 biliões vivem em zonas com o risco de ter esta doença (Rich and Ayala, 2000), principalmente nas regiões tropicais e subtropicais onde a temperatura e a precipitação são mais favoráveis ao desenvolvimento do parasita que causa a doença (Greenwood et al., 2008).

1.1.2- Problemática da malária

Uma das principais razões pela qual a malária continua a causar um número de mortes elevado está relacionada, primeiramente com a resistência do parasita aos fármacos antimaláricos e à resistência do vector aos insecticidas (WHO 2005; Gurarie and McKenzie, 2006). Neste âmbito, têm-se focado esforços no desenvolvimento de novas estratégias para controlar a doença (Feachem and Sabot 2008), nomeadamente no estudo de elementos envolvidos no processo de desenvolvimento do parasita no mosquito (Dong et al., 2006a; Shiao et al., 2006; Zou et al., 2006) e no desenvolvimento de novas vacinas eficazes para o combate da malária, baseadas nos diferentes estádios do ciclo de vida do parasita

(Martinelli et al., 2004). Outro principal problema está integralmente relacionado com o rápido diagnóstico da doença. Um diagnóstico através da observação microscópica dum esfregaço é um dos meios rápidos para identificar as diversas espécies de *Plasmodium* (Gjørup et al., 2007) bem como a parasitémia. No entanto, apesar de ser um dos métodos mais rápidos, nos países onde a malária causa maior número de mortos ainda há escassez destes meios.

Grandes esforços têm sido desenvolvidos a nível do controlo selectivo do vector, de modo a reduzir/eliminar as populações de mosquitos, e os seus contactos com o Homem. Tentar desenvolver técnicas que permitam o diagnóstico precoce (Certain and Sibley, 2007; Tosta, 2007) e um tratamento efectivo da doença de modo a reduzir a morbilidade e a mortalidade associada, são alguns elementos essenciais no combate a este flagelo. O uso de insecticidas no controlo do vector e de antimaláricos contra o parasita têm sido as principais estratégias de combate à doença (Philips 2001; WHO 2007; WHO 2008a).

As várias reacções de defesa do vector envolvem uma variedade de componentes imunológicas que reduzem a população do parasita. Estas variações podem ser atribuídas a diferenças ao nível de infecção, da biologia e da interacção entre o parasita e o vector (Dong et al., 2006b). Esta interacção entre o parasita e o vector tem sido objecto de muitas investigações com aplicações de técnicas moleculares, celulares e métodos genómicos, tendo como alvo principal a identificação de novas vias eficientes para reduzir ou suprimir a transmissão desta doença. O principal foco de estudo neste âmbito tem sido o sistema imunológico do mosquito, responsável pela resposta da invasão pelo parasita *Plasmodium* (Dimopoulos et al., 1997; Tahar et al., 2002; Heard et al., 2004; Chen et al., 2008).

Com a sequenciação do genoma do parasita e do vector (Carlton et al., 2002; Holt et al., 2002; Gardner et al., 2002) vários estudos têm sido levados a cabo para uma melhor compreensão da interacção *Plasmodium*-mosquito-homem e maior investigação no desenvolvimento de fármacos e vacinas para a doença.

1.1.3 - Ciclo de vida do Parasita

A malária humana é causada por um protozoário do género *Plasmodium*. Estes parasitas necessitam de dois hospedeiros para completar o seu ciclo de vida, o Homem e um mosquito do género *Anopheles*. O ciclo de vida possui uma fase assexuada endógena, designada esquizogonia, onde ocorre a multiplicação no hospedeiro vertebrado – hospedeiro intermediário, que pode ser dividida em duas etapas: a esquizogonia exoeritrocitária ou hepática e a esquizogonia eritrocitária. A primeira envolve o desenvolvimento e multiplicação nas células parenquimatosas do fígado e a segunda corresponde ao desenvolvimento dentro do eritrócitos ou glóbulos vermelhos. A outra fase sexuada exógena, designada esporogonia corresponde à multiplicação no hospedeiro invertebrado (fêmea de mosquito) que é também o hospedeiro definitivo.

Após a alimentação de sangue infectado, os gametócitos masculino e feminino diferenciam-se em gâmetas e iniciam a fertilização no lúmen do estômago do mosquito dando origem à única estrutura diplóide em todo o ciclo de vida do *Plasmodium*, o zigoto. Dá-se a meiose. Da maturação do zigoto resulta o oocineto, que irá atravessar o epitélio do intestino médio e alojar-se na lâmina basal onde se irá diferenciar num oocisto. O parasita sofre mitoses sucessivas e origina os esporozoitos. Após a ruptura do oocisto, os esporozoitos migram do hemocélio do mosquito até penetrarem as glândulas salivares (Figura 1, fase A). O mosquito *Anopheles* fêmea é agora um vector de infecção e numa posterior refeição sanguínea irá inocular os esporozoitos na corrente sanguínea do hospedeiro, que rapidamente atingem os hepatócitos. Aqui vão diferenciar-se em trofozoítos que, por sua vez vão originar esquizontes hepáticos ou pré-eritrocitários. Estes produzem, por mitose, milhares de formas invasivas, os merozoítos, que são libertados na circulação sanguínea, dando início à fase eritrocitária (Figura 1, fase B). Quando entra na hemácia, o merozoíto desenvolve-se transformando-se num trofozoíto eritrocítico. Após este período de crescimento o trofozoíto inicia um processo de divisão, originando esquizontes eritrocitários que irão produzir merozoítos. Uma vez libertados na circulação sanguínea, estes vão invadir outras hemácias, perpetuando o ciclo eritrocitário (Figura 1, fase C). Alguns merozoítos

diferenciam-se em formas sexuadas do parasita, gametócitos. A ingestão destes pelo mosquito vai dar início a um novo ciclo (Knell 1991; Greenwood et al., 2008)

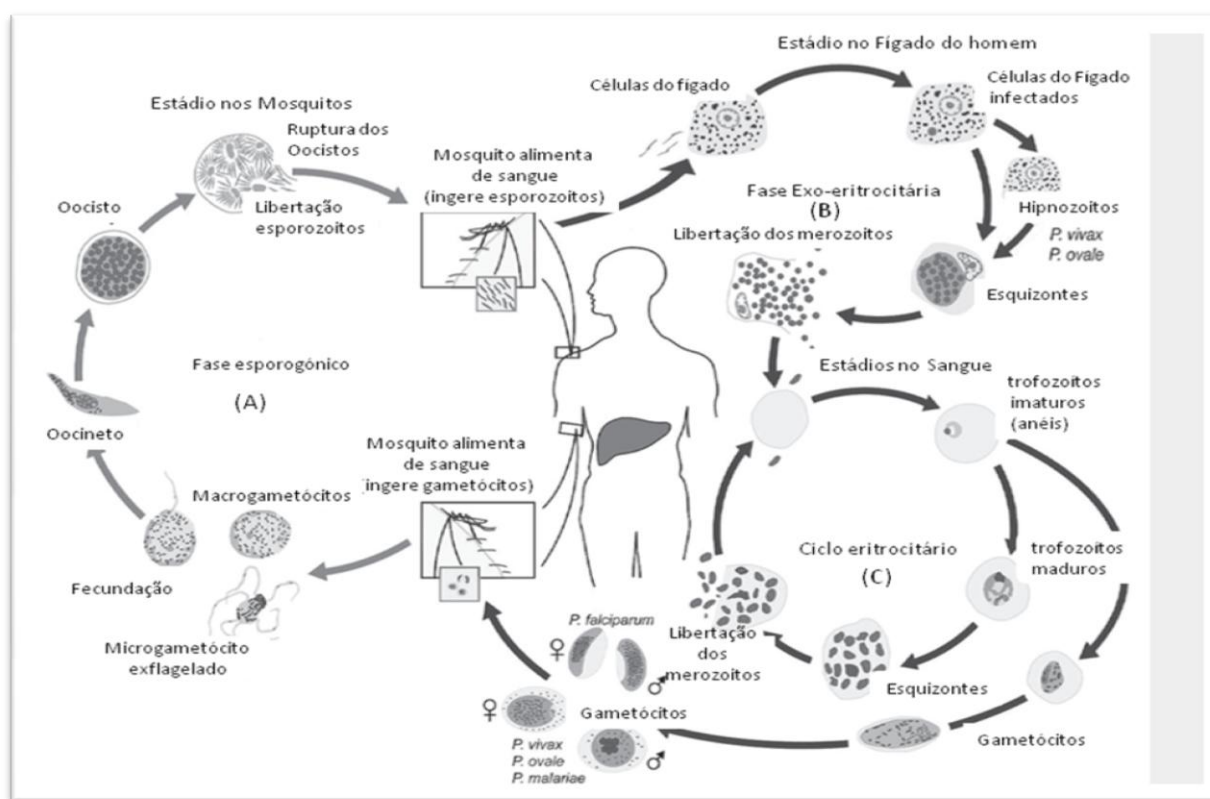


Fig. 1 - Ciclo de vida do parasita da Malária, *Plasmodium* sp., indicando as diferentes fases no hospedeiro vertebrado – homem e no invertebrado – mosquito. Adaptado de Greenwood et al., 2008.

O parasita e o vector da malária, abarcam uma série de interacções envolvendo a invasão e a migração do parasita através do epitélio. Um número significativo de parasita é eliminado por ser susceptível aos mecanismos de defesa do mosquito durante as diferentes fases de diferenciação: (i) na transição entre gametócitos e oocinetos, as enzimas digestivas do estômago (Aguilar et al., 2007) e as reacções imunológicas de *Anopheles* são responsáveis pela eliminação de 90 a 99% dos oocinetos. Além disso, a eficiência de produção de grande quantidade de gâmetas depende da combinação de espécies *Anopheles-Plasmodium* e está correlacionada com a presença de factores de activação do gametócito no intestino médio (Christophides et al. 2004). Durante diferenciação (ii) entre oocinetos e esporozoítos maduros e (iii) entre a passagem dos esporozoítos do intestino médio

para as glândulas salivares, ocorre também uma redução do número de parasitas. Apenas um número reduzido dos gametócitos ingeridos, consegue desenvolver em oocineto e diferenciar em oocistos após a passagem pelo epitélio do intestino médio (Dimopoulos et al., 2001; Blandin and Levashina 2004).

1.1.4 - O Vector

Existem cerca de 430 espécies de *Anopheles*, apenas 70 são vectores da malária em condições naturais e destas 40 são importantes, capazes transmitir as espécies de *Plasmodium* que infecta o Homem. A transmissão destes parasitas aos humanos é exclusiva de mosquitos fêmea do género *Anopheles*, sendo o complexo *A. gambiae* o mais importante em África onde se regista maior número de casos (Service, 2003).

A capacidade de uma espécie de *Anopheles* transmitir a malária ao Homem, está relacionada com, o grau de susceptibilidade de infecção; o grau de antropofilia - a frequência com que as espécies se alimentam em humanos; a longevidade média da população de mosquitos e a sua densidade em relação ao Homem e ainda à possibilidade do parasita completar o seu desenvolvimento i.e., do período de incubação extrínseca (Constantini et al., 1999).

1.2 - Imunidade

Grande parte do sucesso evolutivo dos insectos e outros artrópodes é atribuído à eficiência dos seus sistemas imunológicos, e envolve uma resposta defensiva, quando são invadidos por organismos ou outras substâncias estranhas, impedindo a sua sobrevivência e desenvolvimento (Richman et al., 1997; Dimopoulos et al., 2000). Uma vez que não possuem anticorpos, estes desenvolveram modalidades únicas para detectar e responder aos microrganismos. Estas respostas estão interligadas entre si, começando inicialmente pelo reconhecimento do organismo invasor, que irão induzir diferentes mecanismos efectores como a indução da síntese dos péptidos antimicrobianos, melanização, coagulação, ou reacções de defesas celulares que

consiste predominantemente em fagocitose e/ou encapsulação dos invasores (Hoffmann et al., 1996)

O sistema imunológico é dividido em dois tipos: imunidade própria, inata ou natural e imunidade adaptável ou adquirida. Este último ocorre apenas nos organismos vertebrados, apareceu há cerca de 500 milhões de anos em antepassados de peixes cartilagíneos. Produz receptores por rearranjo de genes somáticos que reconhecem antígenos específicos e permite desenvolver uma memória imunológica (Whitten et al., 2006).

Por sua vez, o sistema imunológico inato é mais antigo, encontra-se em todos os organismos multicelulares e pode ser dividido em resposta humoral e defesas celulares (Jiravanichpaisal et al., 2006). Consiste na acção concertada de diversos tipos de moléculas, sistemas de sinalização e células e compreende três categorias funcionais moleculares envolvidas: (i) no reconhecimento do patógeno, (ii) na sinalização das vias que reconhecem o sinal para amplificação, modulação e transdução, e (iii) nos mecanismos efectores que desencadeiam o afastamento do microrganismo do hospedeiro (fig. 2) (Baton et al., 2008).

As respostas humorais incluem a produção de radicais de oxigénio ou azoto e o complexo da cascata enzimática que regula a coagulação e a melanização e também, as vias de sinalização intracelular, que controla a expressão dos genes efectores do sistema imunológico e tem actividade específica contra várias classes de microrganismos (Dimopoulos et al., 2001; Winter et al., 2006). Incluem ainda a activação da cascata de proteínas constitutivas presentes na hemolinfa como a cascata da pró-fenoloxidase (PPO) e da coagulação (Levashina, 2004; Kurata 2006). Estas respostas podem ser classificadas como sistémicas, quando os componentes de defesas são produzidos pelo corpo gordo e hemócitos, ou local quando o epitélio produz componentes de defesa na proximidade do local de infecção (Dimopoulos, 2003). Estão envolvidas nestas respostas à infecção as reacções epiteliais intracelulares, envolvendo a actina e microtúbulos, que são responsáveis pela remodelação do citoesqueleto, que é a principal resposta do epitélio à penetração do oocineto. Outros mecanismos de defesas também são reconhecidos, como a remodelação da matriz celular, o metabolismo de oxidação/redução e destoxificação e a apoptose (Winter et al., 2006).

As reacções celulares são mediadas por hemócitos que se encontram em circulação no hemocélio e ligados aos tecidos incluindo corpo gordo, traqueia e estômago e incluem fagocitose, encapsulação celular, degranulação e a libertação de substâncias antimicrobianas (Dimopoulos et al., 2002; Kurata 2006).

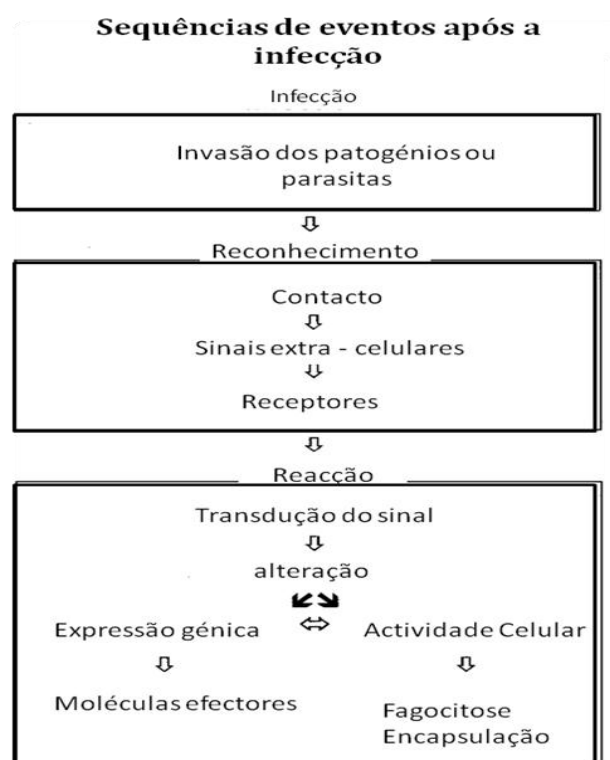


Fig. 2 - Modelo da resposta imunológica dos insectos. O patogénio ou parasita que invade o corpo é reconhecido como estranho. Este reconhecimento químico/físico envolve proteínas solúveis presentes na hemolinfa, bem como proteínas localizadas na superfície dos hemócitos ou noutras células. O reconhecimento inicial leva à comunicação com outros tipos de células através de moléculas que activam a resposta. O estímulo de reconhecimento e sinais secundários levam á transdução do sinal. À adesão celular segue a fagocitose ou encapsulação pelos hemócitos, libertação dos factores de sinalização, ou a indução da transcrição dos genes para a síntese de péptidos antimicrobianas nos corpos gordos e noutros tecidos. (Adaptado de Gillespie et al., 1997)

As respostas inatas são desencadeadas quando os receptores de reconhecimento padrão (PRRs), secretados para o plasma ou localizados na superfície das células, reconhecem e se ligam aos padrões moleculares associados aos patogénios (*PAMPs*) (Christophides et al., 2002). A activação destas respostas imunológicas pode ocorrer directamente no caso da fagocitose e melanização, ou então indirectamente, através da vias de sinalização intracelulares que iniciam a

activação transcricional de péptidos antimicrobiano apropriados e outros genes (Baton et al., 2008).

Estes PRRs servem como opsoninas facilitando a fagocitose, encapsulação e a activação de cascatas proteolítica que posteriormente induzem a melanização, coagulação e a sínteses de péptidos antimicrobianos (AMPs). Funcionam também como receptores para transdução de vias que levam à síntese de efectores anti-patogénicos e como indicadores de modificações das cascatas proteicas que estão implicados em diferentes fases da imunidade (Christophides et al., 2002; Jiravanichpaisal et al., 2006). Actuam geralmente ao nível da membrana dos microrganismos, quando estes são reconhecidos como não-próprio (Bidla et al., 2005; Haine et al., 2006).

1.2.1 - O Reconhecimento do Não-Próprio (Nonself)

Um dos componentes essenciais da imunidade é o mecanismo pelo qual o organismo pode detectar corpos estranhos ou a presença de moléculas alheias. Este reconhecimento do destes organismos como não-próprio estimula as respostas defensivas. Os artrópodes desenvolveram sistemas que reconhecem padrões moleculares característicos dos polissacarídeos microbianos, nomeadamente as respostas aos peptidoglicanos das paredes celulares bacterianas, ao Lipopolissacarídeos (LPSs) da membrana externa das bactérias Gram-negativas, e aos β -1.3 glucanos e β -1.3 mananos da parede celular dos fungos (Gillespie et al. 1997).

Neste processo o LPS estimula a síntese de proteínas de hemolinfa associadas às respostas antibacterianas, principalmente no reconhecimento das bactérias Gram-negativas. As lectinas que participam na remoção das bactérias da hemolinfa, funcionam como sinal de reconhecimento e subseqüentes respostas dos hemócitos, tendo capacidade de se ligar às estruturas dos oligossacarídeos presentes na superfície das células. Os β -1.3 glucanos por sua vez são componentes da parede celular dos fungos e funcionam como padrões de reconhecimento de sinal. O seu reconhecimento constitui o primeiro componente nas cascatas da PPO desencadeada em resposta aos fungos (Christophides et al., 2002; Christophides et al., 2004).

Uma das primeiras resposta dos hemócitos desencadeada pelo sistema imunológico é a fagocitose. É um complexo processo celular e uma forma simples de defesa associado à actividade da opsonização envolvendo lectina dos insectos, através da qual, as células reconhecem e destroem organismos invasores como pequenas partículas invasoras e bactérias (fig. 3) (Dimopoulos et al., 1998; Schimed-Hempel 2005). Nos insectos as células granulares e os plasmócitos são as principais células fagocitárias, e as suas capacidades são estimuladas através da activação da cascata de PPO (Gillespie et al., 1997).

Encapsulação e nodulação – agregação hemocítica multicelular - são outros tipos de respostas imunológica, restrita aos invertebrados na defesa contra organismos com tamanhos incapazes de serem fagocitados por hemócitos individuais (Dimopoulos et al., 2001; Jiravanichpaisal et al., 2006) promovendo o seu aprisionamento nos tecidos do hospedeiro e levando a sua posterior destruição (fig 3) (Barraco et al., 2007). Estas reacções além de aprisionarem os patogénios, limitam as respostas imunológicas apenas à região agredida, o que ajuda a proteger os tecidos do hospedeiro dos danos causados por moléculas tóxicas produzidas durante o processo inflamatório. Nas regiões mais centrais desses agregados de hemócitos, sucede também a uma pigmentação escura, ou melanização, resultante da libertação de compostos imunoefectores presentes nas células hemocíticas (Barraco et al., 2007).

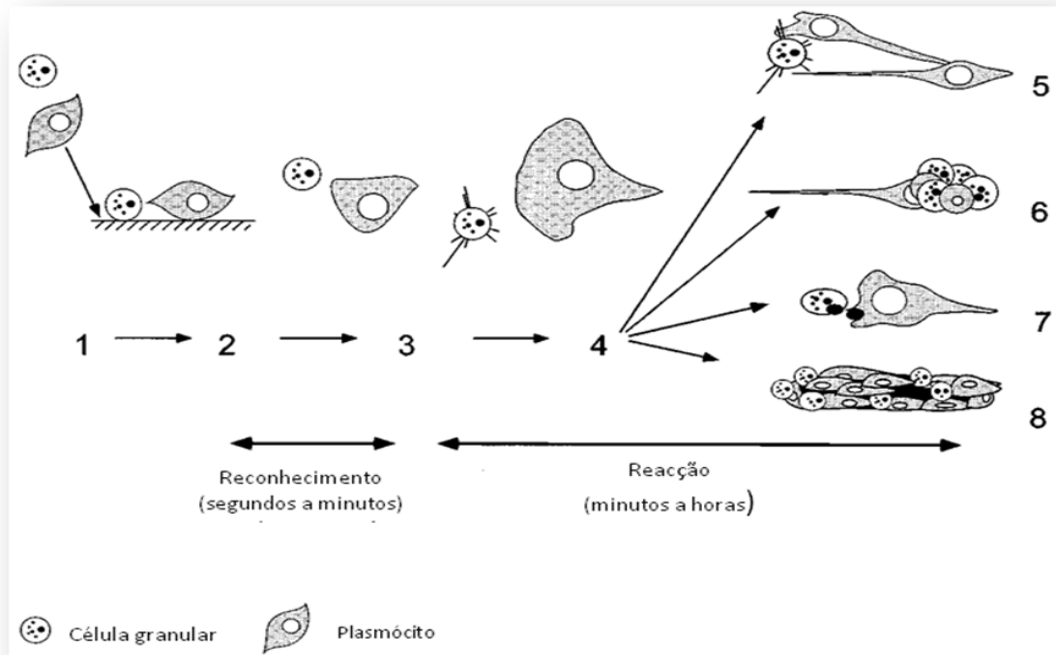


Fig. 3 – Modelos das reacções defensivas na activação dos hemócitos. Hemócito em circulação ou numa superfície estranha (1) tem o contacto endógeno (2). Quando recebe o sinal por factores endógenos, ou reconhece a superfície como não-próprio, adere á superfície através de factores de adesão e/ou receptores da superfície das células (3). A activação e os eventos de reconhecimento levam ao aumento da filopodia de células granulares e pseudopodia de plasmócitos (4). Finalmente, hemócitos espalham-se alterando a sua configuração (5) forma agregados (6) fagocita pequenos patogénios (7) ou encapsula parasitas maiores (8) (Adaptado de Chen et al., 2008).

Nos insectos são reconhecidos dois tipos de encapsulação: a humoral que ocorre com ou sem a participação dos hemócitos e está associada a actividade da fenoloxidase (PO), e a celular que pode ocorrer sem qualquer sinal da melanização. Este processo é mais complexo que a fagocitose uma vez que requer sinais intercelulares para recrutamento e cooperação de muitos hemócitos (Gillespie et al., 1997).

1.2.2 -Em *Anopheles gambiae*

Nos insectos, a membrana peritrófica (PM) do estômago, a cutícula do exoesqueleto e o revestimento traqueal do sistema respiratório constituem as principais barreiras físicas contra os invasores. Quando estas barreiras são ultrapassadas dá-se o processo de reconhecimento dos invasores, activa-se os mecanismos chaves, como cadeias de proteases serínicas com motivo CLIP que por sua vez activam a sinalização das vias conducentes à síntese dos AMPs, aglutinação da hemolinfa e melanização (Osta et al., 2004).

A proteína contendo tioéster 1 (TEP1), actua como opsonina promovendo a fagocitose das bactérias Gram-. A sua activação pela infecção resulta na clivagem proteolítica levando à sua ligação ao parasita por uma ponte tioéster. No epitélio do estômago de *Anopheles*, TEP1 medeia a morte dos oocinetos de *P. berghei*. TEP3 e TEP4 são sob regulados em mosquitos infectados (Christophides et al., 2002; Christophides et al., 2004; Osta et al., 2004), o que sugere que os outros genes desta família também podem desempenhar funções ligadas às respostas imunológicas do mosquito. Segundo Christophides et al., (2004) o genoma de *Anopheles* codifica 15 genes TEPs.

Outras proteínas identificadas e que participam nas respostas imunes de *A. gambiae* são as Proteínas de reconhecimento de peptidoglicanos (PGRPs). Foram identificadas sete genes diferentes da família dos PGRPs, dos quais três pertencem à subfamília S (short) extracelular, que codifica proteínas segregadas (PGRPS1, S2 e S3) e quatro pertencentes à família L (long) (PGRPLA, LB, LC e LD) codificando produtos transmembranares ou intracelulares (Christophides et al., 2004).

As proteases serínicas com motivos CLIP são fundamentais para a amplificação e regulação do sinal. Análises filogenéticas revelam a existência de quatro grupos de CLIPs no genoma de *Anopheles*, contendo 44 genes, três dos quais contêm domínios duplos (Christophides et al., 2004; Volz et al., 2005). A CLIPB14 desempenha papel de sob regulação persistente em mosquito infectado com *Plasmodium* e o CLIPB15 faz a sob regulação transiente durante a invasão do estômago. Estas duas proteases em conjunto desempenham um papel importante

na melanização que não requer a presença dos hemócitos e estão envolvidos na defesa contra as bactérias Gram-negativas (Volz et al., 2005). CLIPB9, CLIPB4 e CLIPB1 são induzidas durante as respostas imunológicas e têm sequências características das enzimas activadoras da PPO (Osta et al., 2004; Rodrigues et al., 2007). Por sua vez a transcrição do CLIPA6 é induzida pela infecção bacterial e suprimida por *Plasmodium* (Christophides et al., 2004).

A melanização é outro mecanismo de defesa que requer a activação proteolítica da PPO em fenoloxidase (PO). As POs convertem substâncias fenólicas como a tirosina, DOPA e dopamina, em quinonas e consequente formação de melanina (Schmid-Hempel 2005). Está envolvida nos processos de pigmentação e esclerotização da cutícula e melanização dos invasores (Osta et al., 2004). Este processo envolve o balanço entre as proteases com motivo CLIP e os seus inibidores, as serpinas. Foram encontrados 9 genes que codificam PPO em *A. gambiae*, PPO1 – 4 são expressos nos estádios pré-adultos; PPO5 e PPO6 são expressos nos mosquitos adultos. Outros genes como PPO2, PPO3 e PPO9 são induzidos depois da alimentação sanguínea, sendo o PPO9 o mais abundante (Christophides et al., 2004; Osta et al., 2004). PPO está presente na hemolinfa, plasma ou hemócitos e nalguns casos em ambos, dependendo da espécie de insecto. Após a activação da PPO, formam-se as quinonas por derivados de tirosina, que levam à produção de melanina que faz parte do componente das respostas defensivas de muitos parasitas de insectos e patogénios (Gillespie et al., 1997).

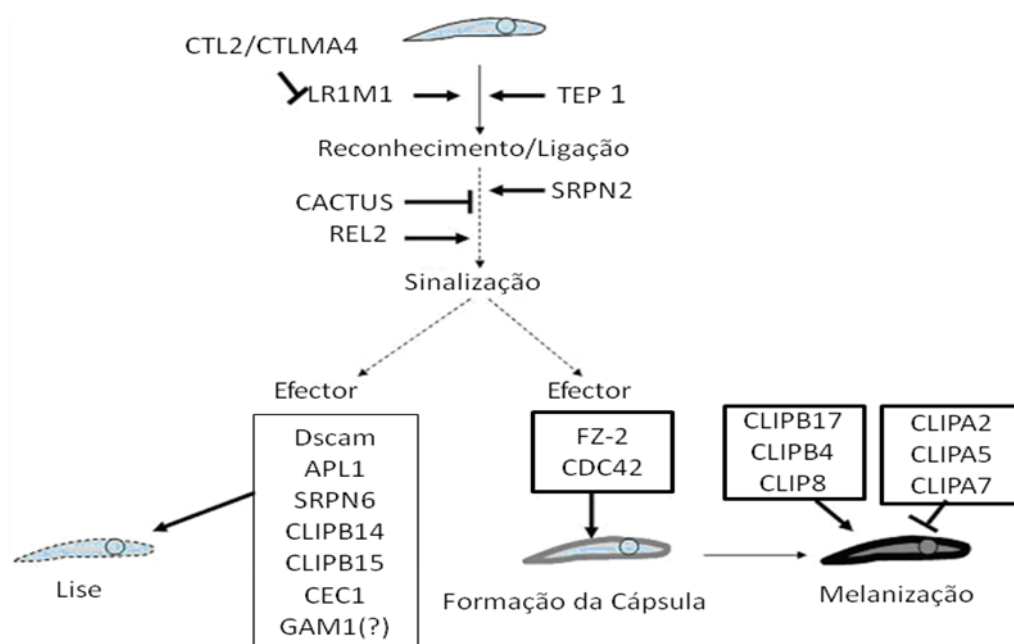


Fig. 4 – Genes que controlam a intensidade e/ou resposta à infecção. Esta figura mostra a sequência hipotética dos eventos durante a resposta do mosquito à infecção do parasita da malária. A função destes genes nos diferentes estádios é influenciada pela intensidade de infecção e encapsulação. A partir de um certo ponto as vias divergem levando a genes com fenótipos específicos. *CTLs* - lectinas tipo C; *CTLMA* - *CTLs* com ligações de manose; *LR1M1* - imunológicas ricas em leucina; *TEP* - Proteína contendo tioéster; *SRPN* - genes que codificam serpinas; *REL* - factor de transcrição; *Dscam* - (célula de adesão molecular do síndrome de Down); *CEC* - cecropinas; *Gam* - gambicinas; *Fz-2* - Gene frisado; *CDC* - células da divisão celular; *CLIP* - Serinas proteases com domínio clip. (Adaptado de Chen et al., 2008).

A partir do primeiro estudo do RNAi de *A. gambiae* muitos outros se seguiram no âmbito da imunidade do mosquito e no papel de diferentes genes durante a infecção do mosquito com *Plasmodium*. O silenciando de *TEP1* ou de *LRIM1* resulta no aumento de nível de infecção dos oocistos de *P. berghei*, “knock-down” de dois *CTLs* resulta no aumento da melanização do parasita. Estudos do papel das proteases serínicas e seus inibidores de serpinas nas respostas imunológicas ao *Plasmodium*, no processo de regulação da melanização, demonstram que a regulação da lise do oocineto e melanização é um processo complexo envolvendo interações entre múltiplas proteases serínicas / serpinas, em que umas promovem e outras inibem as reacções imunológicas inatas (Baton et al., 2008). O funcionamento destas proteases serínicas e das serpinas está

relacionado com diferentes contextos genéticos. Silenciamento de certas famílias de proteases serínicas, como a CLIPA e CLIPB e serpinas, resulta em efeitos diferentes ou opostos na infecção do parasita. Estudos com células e mosquitos adultos mostram que sinalização das vias imunológicas intracelular de Toll/REL1 regula a expressão de vários péptidos antimicrobianos e PRRs, incluindo Cec 1 e 3, Def1, gambicina, TEP1 e LRIM (Baton et al., 2008).

1.3 – Coagulação

Uma das principais diferenças entre vertebrados e invertebrados é o facto de nos vertebrados os líquidos do corpo estarem confinados na maior parte ao sangue e aos vasos linfáticos enquanto os invertebrados têm um sistema circulatório aberto (Christophides et al., 2002; Haine et al., 2006;).

A coagulação é uma função conservada, necessária para a sobrevivência das espécies (Chen et al., 2005). Além de prevenir a perda da hemolinfa e a disseminação dos organismos patogénicos pela cavidade corporal do animal, desempenha ainda um papel importante, a nível da hemostasia, cicatrização das feridas e defesas imunológicas e envolve componentes celulares e humorais (Christophides et al., 2002; Theopold et al., 2002; Bidla et al., 2007). A coagulação é induzida quando a transglutaminase (Tgase) é libertada dos hemócitos ou tecidos e reage formando ligações cruzadas entre as moléculas tipo fibrinogénio da hemolinfa produzindo um coágulo (Jiravanichpaisal et al., 2006).

Em geral, nos insectos a coagulação da hemolinfa é um dos mecanismos utilizados nas respostas aos ferimentos e a infecções bacterianas e compreende quatro fases (Theopold et al., 2004; Agianian et al., 2007). A primeira fase corresponde a degranulação dos hematócitos e a formação de agregados extra celulares, em que os hematócitos migram para os sítios da infecção, gerando uma resposta inflamatória ocorrendo então a fagocitose e/ou a formação de agregados celulares densos em torno das partículas invasoras. (Ciprandi et al., 2003; Jiravanichpaisal et al., 2006).

Na segunda fase dá-se a formação da cascata proteolítica: sistema de activação da PPO. A formação de nódulos e cápsulas hemocíticas é acompanhada por uma reacção de melanização, na qual a coagulação da hemolinfa e a migração dos hematócitos para o local de ataque permitem a formação de um tampão celular até que uma nova cutícula seja reconstituída. A biossíntese de melanina envolve uma série de reacções químicas em cascata, denominadas sistema PPO. A activação da forma inactiva ou PPO para a enzima activa ou PO ocorre pela acção de proteases serínicas, denominadas enzimas activadoras da PPO (*PPO activating enzymes* ou PPAEs). Inicia uma cascata proteolítica cujo produto final é a melanina (Ciprandi et al., 2003; Theopold et al., 2002; Theopold et al., 2004; Jiravanichpaisal et al., 2006).

Na terceira fase, os plasmócitos são atraídos e espalhados para fora do hemocélio através do coágulo. E, por fim, ocorre a regeneração da epiderme que cresce através do local da ferida. Embora pouco se saiba sobre a iniciação destas reacções sabe-se que a dispersão dos plasmócitos é provocada por um factor libertador dos plasmócitos (Jiravanichpaisal et al., 2006).

Estudos recentes demonstram que a coagulação dos insectos envolve a interacção entre os factores celulares e humorais. Enquanto na *Drosophila* a coagulação ocorre nas formas lavares e não requer a presença da PO, em *A. gambiae* é mais delicada, não é viscosa, não agrega grânulos e os principais factores de coagulação, são a lipoforina e a PO (Scherfer et al., 2004; Bidla et al., 2005; Haine et al., 2006).

1.4 - Transglutaminase

As Transglutaminases (Tgase) são um grupo de enzimas relacionadas funcional e estruturalmente que catalisa modificações pós-traducionais de proteínas através de reacções de transferases dependentes do Ca^{2+} . Estas reacções ocorrem entre o grupo γ -carboxamida da cadeia peptídica dos resíduos de glutamina e várias aminas primárias (Yee et al., 1994; Aeschlimann et al., 2006). A formação destas ligações altera as suas propriedades físico-químicas e tem uma importante consequência biológica uma vez que confere uma maior estabilidade

proteica e resistência à degradação física e química. Estas reacções são particularmente relevantes para o funcionamento da matriz extracelular (Folk 1980; Zemskov et al., 2006).

A nível patológico está envolvida na protecção e prevenção de perda de sangue, reparação dos tecidos além de ser essencial no processo de coagulação. Desregulação da sua actividade enzimática geralmente associada à interrupção dos mecanismos homeostáticos celulares tem originado doenças humanas como neurodegeneração, doenças auto-imunológicas, doenças infecciosas, fibrose progressiva dos tecidos, doenças da pele, entre outras (Adini and Warburg 1999; Adini et al., 2001; Kim et al., 2002; Beninate and Piacentini 2004).

Actualmente são conhecidas algumas isoenzimas da Tgase. A mais conhecida trata-se do **Factor XIIIa**, uma Tgase do plasma que é activada por clivagem proteolítica na forma proenzima e mediada por trombina em resposta ao Ca^{2+} . Forma-se em locais de coagulação do sangue controlando assim a sua perda após um ferimento, onde catalisa a formação de uma ligação $\epsilon(\gamma\text{-glutamil})$ lisina entre os monómeros de fibrina ou fibrina e o inibidor de α_2 -plasmina (Wasserman et al. 1999; Noguchi et al., 2001; Beninate and Piacentini, 2004; Eckert et al., 2005;) Exemplos de outras estudadas: A TGase do queratinócito (**Tgase 1**) activada por proteólise e envolvida na diferenciação terminal dos queratinócitos; **Tgase 2** dos tecidos envolvida na reparação e remodelação da matriz epitelial; A **Tgase 3** – Tgase do folículo epidermal/cabelo envolvido na diferenciação terminal dos queratinócitos; **Tgase 4** – essencial na fertilização dos roedores e as mais recentes, **Tgase 5-7**, pertencentes a superfamília de proteases de cisteína (Kim et al., 2002; Ciprandi et al., 2003; Beninate and Piacentini, 2004; Eckert et al., 2005; Fésus and Szondy 2005).

A Tgase está presente nas várias fases de vida do parasita da malária, desde zigoto, oocineto até ao oocisto. De acordo com Adini et al., 2001, Tgase de *Plasmodium* tolera temperatura entre os 26 e 37°C, permitindo assim, à enzima catalisar reacções nas mais variadas condições a que o parasita da malária está sujeita durante o seu desenvolvimento no vertebrado e no mosquito. A sua actividade foi quantificada a pH 8.5 e a maioria das Tgases conhecidas requerem iões de Ca^{2+} , no entanto a actividade de Tgase de *Plasmodium* é independente de

Ca^{2+} , isto porque funciona dentro dos glóbulos vermelhos (RBC) onde há poucas concentrações de Ca^{2+} .

Vários outros processos celulares dependem de níveis adequados de Tgases, tais como: crescimento, reprodução e morte celular. Também intervém na diferenciação e na potencialidade proliferativa de diferentes tipos de células (Beninati and Piacentini, 2004). A complexidade desta proteína, a multiplicidade da sua actividade enzimática e interacções moleculares e, o seu envolvimento em várias funções celulares fazem com que seja importantes estudar as suas actividades.

1.5 - Objectivos

O objectivo geral deste trabalho é estudar o papel da coagulação na resposta do mosquito *Anopheles gambiae* ao *Plasmodium berghei*, através do estudo da transglutaminase.

E como objectivos específicos:

- Caracterizar os genes que codificam transglutaminases em *Anopheles gambiae*, através da sequenciação do gene e dos seus transcritos;
- Caracterizar o papel desta enzima durante a infecção com *Plasmodium berghei*, através de:
 - a. Descrição da dinâmica de transcrição durante a infecção.
 - b. Inibição da actividade enzimática;
 - c. Silenciação do gene usando dsRNA; e

II - MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 - Produção e manutenção dos mosquitos

Os mosquitos da espécie *Anopheles gambiae* s.s. Gilles 1902, estirpe Yaoundé com 5 a 6 dias foram utilizados para as experiências de caracterização dos genes e silenciamento dos mesmo. Estes foram criados no insectário do CMDT/IHMT e mantidos a 25°C, 75% de humidade relativa, com um fotoperíodo de 12h (luz/escuro). Os adultos foram alimentados com solução de glucose a 10% (Abrantes et al., 2005). Foram utilizadas apenas as fêmeas para todas as experiências, uma vez que estas são as únicas que picam o homem para dele se alimentarem transmitindo assim, o parasita da malária.

2.2 - Caracterização dos genes que codificam a transglutaminase de *Anopheles gambiae*

Existem 9 genes anotados no genoma de *A. gambiae* que codificam para a Tgase (ensembl.org) Neste estudo foram abordados os genes AGAP009097 (97) e AGAP009098 (98) localizados no cromossoma 3R (fig. 1). A caracterização destes genes que codificam a Tgase foi feita através da sequenciação destes e dos seus transcritos. Como a Tgase está envolvida em diferentes processos fisiológicos, os diferentes genes poderão ser expressos diferencialmente em função do tecido, fase de ciclo de vida do mosquito e parasita. Por isso, foi feita a extracção de RNA de diferentes partes do corpo do mosquito, nomeadamente estômagos e corpo gordo.

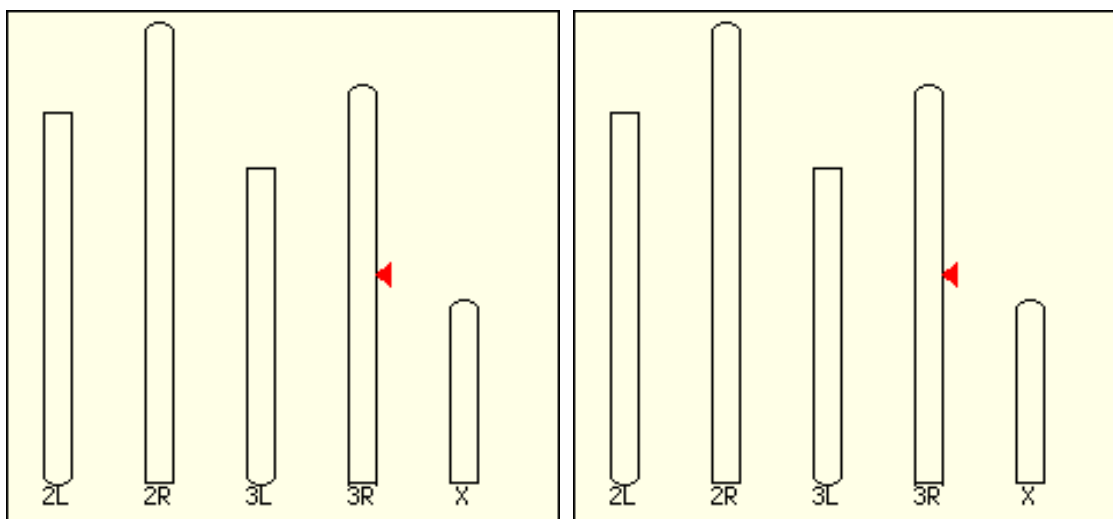


Fig. 5 – Representação esquemática dos cromossomas do mosquito *Anopheles gambiae* e localização dos genes AGAP009097 e AGAP009098 respectivamente à esquerda e direita.

2.2.1- Extracção de DNA

O DNA genómico foi extraído a partir de tecidos do mosquito, e de culturas de células, seguindo o protocolo da DNeasy Tissue kit da QIAGEN. Os mosquitos foram dissecados, recolheu-se abdómenes que foram colocados em tubos de 1,5 ml, adicionou-se 180 µl de Tampão ATL e 20 µl da proteinase K. A mistura foi incubada a 55°C. Durante a incubação que durou duas horas, as amostras foram misturadas por vortex.

Adicionou-se 200 µl do Tampão AL misturou-se por vortex e incubou-se a 70 °C durante 10 minutos. Adicionou-se 200 µl de Etanol 100% e misturou-se. As misturas foram pipetadas para tubos de 2 ml previamente preparados com mini colunas de DNeasy. Centrifugou-se a 8000 rpm durante 1 minuto. Retirou-se o tubo de colecção. Colocou-se as colunas num novo tubo de 2 ml, adicionou-se à coluna 500 µl do Tampão AW1 centrifugou-se a 8000 rpm durante um minuto. Despejou-se o tubo. Foi adicionado à coluna 500 µl do Tampão AW2, centrifugou-se a 14000 rpm durante 3 minutos de modo a secar a membrana do DNeasy. Retirou-se as colunas dos tubos e foram colocados em novos tubos de 1,5 ml. Pipetou-se 200 µl do Tampão AE directamente para a membrana. Incubou-se à temperatura ambiente durante 1 minuto, e centrifugou-se a 8000 rpm durante um minuto. Recolheu-se as amostras de DNA, que foram armazenadas a -20 °C.

Para a extracção a partir de culturas de células, aproximadamente 5×10^6 células foram centrifugadas a 8000 rpm, durante 5 minutos. Adicionou-se 200 µl de proteinase K, misturou-se por vortex e incubou-se a 55 °C, de modo a dar-se a lise das células. Adicionou-se 400 µl de Tampão AL, previamente misturado com Etanol, e misturou-se. O resto do procedimento foi idêntico ao da extracção de DNA a partir do tecido.

Obtiveram-se assim as amostras de gDNA, do mosquito *A. gambiae* *estirpe Yaoundé*, que posteriormente foram utilizadas para as restantes experiências.

2.2.2 – PCR

A técnica de PCR permite a detecção do material genético. Consiste na síntese “in vitro” de milhões de cópias de um fragmento de DNA molde cujas extremidades são complementares a um par de oligonucleótidos (“primers”) usados conjuntamente com a enzima Taq polimerase numa série de ciclos sucessivos de desnaturação e extensão da sequência alvo.

A amplificação por PCR foi realizada em 30 µl mistura de reacção, contendo 1 µl de amostra DNA, adicionado a uma mistura de 6,0 µl de tampão de PCR 5x tampão (Promega), 1,80 µl Cloreto de Magnésio a 1,5 mM de (MgCl₂), 1,20 µl de dNTP a 200 mM, 0,18 µM de primers a 0,5 µM forward e reverse respectivamente (tabela 1), 1U de Taq e H₂O ultra-pura perfazendo 29 µl. Os primers foram agrupados em diferentes pares, de acordo com a tabela 2, de modo a cobrir as regiões codificantes e UTRs dos 2 genes (tabela 2 e Figura 6).

Tabela 1 – Sequência dos primers utilizados para a sequenciação dos genes AGAP009097 e AGAP009098

<i>Nome do primer</i>	<i>Sequência 5' – 3'</i>
Array05-rev	GAGGTGTGGCTGAAGCGTCCCGAT
Array05-fwd	TGCCGCATCGTCACCAACTTCT
TGM-097-RT-fwd	GATCGAGTGTTCGGGATTGT
TGM-097-RT-rev	CTCGTTCAAGGGAAGCACTC
TGM-097-long-rev	GCAAATGATCGATGCAACAC
TGM-098-long-fwd	AGTGGCAAGGTGTTACAGCA
TGM-098-long-rev	GACGATGATCTGGAAGGGAA

Tabela 2 – Combinação de primers utilizados nas várias misturas de reacção da PCR e posterior sequenciação dos genes

<i>mistura</i>	<i>primers</i>	<i>gDNA bp</i>
A	TGM-098-long-fwd + Array05-rev	1380
B	Array05-fwd + TGM-097-RT-rev	1097
C	TGM-097-RT-fwd + TGM-097-long-rev	336
F	TGM-098-long-fwd + TGM-098-long-rev	854

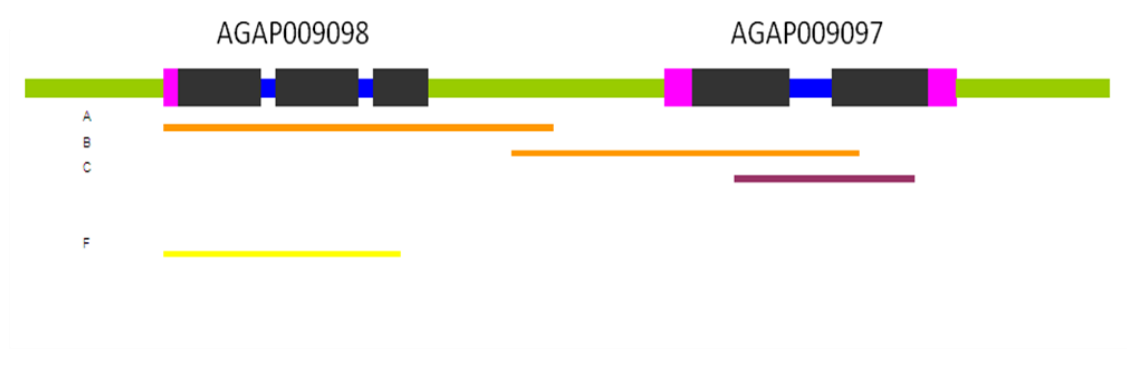


Fig. 6 – Esquema da localização genómica dos locais de amplificação obtidos com os pares de primers descritos na tabela 2. A, B, C e F - misturas de reacção A, B, C e F respectivamente.

As condições da reacção de PCR consistiram em 38 ciclos de amplificação, após uma desnaturação inicial a 94°C durante 3 minutos. Cada ciclo com as seguintes fases: a 94°C durante 30 segundos para desnaturação das cadeias de DNA, a 55°C durante 30 segundos promovendo a ligação dos primers ao DNA molde – annealing e 90 segundos a 72°C para extensão das cadeias complementares. Sucedeu-se a um período de extensão final a 72°C durante 5 minutos. A reacção de PCR decorreu no termociclador da marca Biometra, modelo TGradiente.

2.2.3- Electroforese

Para a leitura e interpretação dos resultados, os produtos amplificados foram submetidos a electroforese em gel de agarose a 2%, corados com brometo de etídio e visualizados num transiluminador, sob luz ultravioleta (UV).

Ao produto amplificado adicionou-se 1 µl de tampão de aplicação - Orange G (Sigma) por cada 5 µl de amostra. A electroforese decorreu em tampão TBE a 120 V durante mais ou menos 1 hora. Um marcador de peso molecular (Hipper Ladder II 100 lanes) da Bioline foi utilizado para determinação do tamanho aproximado do produto de PCR. O gel foi visualizado através de radiação ultravioleta e fotografado num sistema de documentação fotográfica UVIDOC.

2.2.4 - Purificação do produto de PCR

Depois de confirmado o produto de PCR através de electroforese, procedeu-se à purificação do mesmo para posterior sequenciação. A purificação foi feita com o kit SureClean da Bioline, “protocols for tubes or 96/384 wells”, em que, se adicionou a mesma quantidade de SureClean ao produto de PCR, e se misturou bem. Incubou-se à temperatura ambiente durante 10 minutos. Centrifugou-se a 14000 rpm durante 10 minutos e retirou-se o sobrenadante. Adicionaram-se dois volumes de etanol a 70% para um volume do produto de PCR e misturou-se com vortex durante 10 segundos. Centrifugou-se a 14000 rpm durante 10 minutos, retirou-se o sobrenadante e deixou-se os tubos abertos durante 2 horas aproximadamente, de modo a secar o excesso de etanol. O produto final foi ressuspendido em 50 µl água ultra pura.

Depois de purificado foi feita uma nova electroforese em gel de agarose a 2% para confirmação a quantificação do produto.

2.2.5- Quantificação

Foi feita uma diluição a 2%, e procedeu-se à leitura da absorvância no Gene Quant II (Pharmacia Biotech). Programou-se a máquina com um factor 50 para dsDNA. Antes de quantificar o produto, a cuvete foi lavada por água destilada, e calibrou-se o espectrofotómetro com água ultra pura. Posteriormente as amostras

foram quantificadas. Entre cada amostra a cuvete foi lavada sempre com água destilada, tendo sempre o cuidado de retirar por completo toda a amostra, de modo a não interferir com as medições seguintes. No fim, repetiu-se uma nova medição de referência de modo a confirmar os resultados.

2.2.6- Sequenciação

Os produtos purificados foram enviados para uma empresa de biotecnologia (Macrogen, Coreia do Sul) a qual procedeu a sequenciação. Para cada amostra obtiveram-se sequências sense e anti-sense, de acordo com a combinação dos primers pré-definidos (tabela 2). As sequências obtidas foram alinhadas por ClustalW disponível no Programa Bioedit Sequence Alignment Editor e corrigidas manualmente.

2.2.7- Extracção de RNA

A extracção foi feita utilizando o protocolo para a purificação total de RNA a partir de culturas de células e tecidos com NucleoSpin® RNAII. O material recolhido dos mosquitos, neste caso estômagos e corpo gordo, cerca de 30 mg por cada tubo, foi homogeneizado e adicionado a 350 µl de solução de lise de RNA, Tampão RA1 3,5 µl de β mercaptoetanol, misturou-se por vortex. O material lisado foi filtrado em unidades de filtração NucleoSpin® previamente postos em tubos. Centrifugou-se durante um minuto a 14000 rpm. Retirou-se o filtro, colocou-se em outro tubo colector e adicionou-se 250 µl de etanol a 70% misturou-se por pipetagem. Centrifugou-se durante 30 segundos a 14000 rpm. As colunas foram posteriormente postas em novos tubos às quais se adicionou 350 µl de MBD (Membrane Desalting Buffer). Foram centrifugadas durante um minuto até secar a membrana.

Foi preparada previamente uma mistura de reacção de DNase em que para cada isolado se adicionou 10 µl de DNase a 90 µl de tampão para rDNase num tubo. Aplicou-se 95 µl desta mistura no centro da membrana de sílica da coluna e deixou-se incubar á temperatura ambiental durante 15 minutos.

À membrana foi adicionado 200 µl do tampão RA2 e centrifugou-se durante 1 minuto a 14000 rpm. Passou-se a coluna para um novo tubo, adicionou-se mais 600 µl do tampão RA3 e centrifugou-se durante um minuto também a 14000 rpm, despejou-se o tubo e fez-se a terceira e última lavagem com o 250 µl tampão RA3 e centrifugou-se durante 2 minutos a 14000 rpm de modo a secar completamente a membrana. Por fim o RNA foi eluído em 40 µl de água (RNase-free) centrifugou-se durante um minuto a 14000 rpm e guardou-se a -70°.

2.2.8- Síntese de cDNA

O cDNA foi sintetizado de acordo com o protocolo do kit da Promega a partir do RNA extraído anteriormente, em 2.2.7. A cada tubo de 1,5 ml estéril, foi adicionado 2,5 µl de oligodT (200 µg/µl), e 17,26 µl de água ultra-pura. Aqueceu-se a mistura a 72 °C durante 5 minutos sendo de seguida colocada em gelo, de modo a evitar a formação de estruturas secundárias. Foi adicionado 5,0 µl de tampão M-MLV 5x, 1,0 µl de MMLV-RT (100 u), 10mM de dNTPs e 2 µg de RNA. Misturou-se e incubou-se a 37 °C durante 60 segundos. E por fim a extensão foi feita a uma temperatura de 42 °C. As amostras de cDNA assim sintetizadas foram conservadas a -20 °C.

2.2.9 – PCR

O cDNA foi utilizado como molde em reacções de PCR com diferentes combinações de primers de modo a amplificar os diferentes exões da zona codificada (Tabela 3; Fig.7)

Tabela 3 – Combinações dos vários primers utilizados para a reacção de PCR com o cDNA

<i>primers</i>		<i>gDNA</i>	<i>cDNA</i>
		<i>bp</i>	<i>bp</i>
C	TGM-097-RT-fwd + TGM-097-long-fwd	336	261
D	TGM-097-RT-fwd + TGM-097-RT-rev	186	113
F	TGM-098-long-fwd + TGM-098-long-rev	854	702
H	TGM-098-RT-fwd + TGM-098-long-rev	466	394

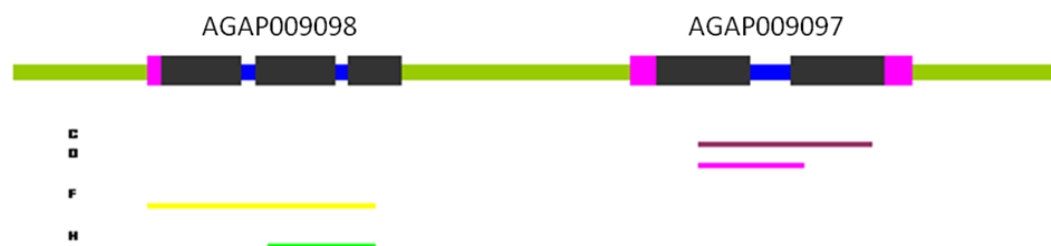


Fig. 7 – Esquema da localização cromossômica dos locais de amplificação obtidos com os pares de primers descritos na tabela 3. C, D, F e H - misturas de reacção C, D, F e H respectivamente.

Para cada uma das combinações foi utilizado 1,0 µl de cDNA proveniente de intestinos médios infectado e não infectado, 3,0 µl de tampão de PCR 5x (Promega), 1,5 mM de cloreto de magnésio, 200 µM dNTP, 0,5 µM de primers “forward” e “reverse” ou 0,5 µM de primer forward e reverse, 1U de Taq e H₂O ultra-pura perfazendo um total de 30 µl para cada amostra.

As condições da reacção de PCR foram as mesmas utilizadas para as amostras de gDNA e descritas anteriormente (2.2.2). Após amplificação, foi realizada electroforese num gel de 2% utilizando os mesmos procedimentos para o gDNA. Procedeu-se à purificação do produto de PCR com o kit SureClean da Bioline, fez-se a quantificação do produto purificado e um novo gel para confirmar, e por fim mandou-se sequenciar na empresa MacroGene

2.3 - Caracterização do papel da transglutaminase durante a infecção por *Plasmodium berghei*.

2.3.1. – Infecções experimentais

Fêmeas de murganhos - *Mus musculus* (estirpe BALB/c) com cerca de 6 a 8 semanas de idade, adquiridas no biotério do IHMT e mantidas numa sala com temperatura média de 22-26°C e ciclos de 12 horas luz/escurecimento, foram previamente separadas em dois grupos: um que serviu de controlo não infectado e outro ao qual se procedeu à infecção com o parasita *P. berghei*, Vinke & Lips 1948 (estirpe Anka). Cada murganho foi injectado intraperitonealmente com eritrócitos parasitados e mantido com uma solução de PABA (Sigma) a 0,05% até ser utilizado para alimentação dos mosquitos.

A progressão da infecção foi acompanhada através da observação microscópica de esfregaços sanguíneos realizados a partir da veia da cauda. Os esfregaços foram fixados com metanol durante 1 minuto e corados com solução de *Giemsa* (Merck) a 20%, durante 20 minutos. Para a visualização dos esfregaços sanguíneos, o cálculo da gametocitémia e a taxa de parasitémia, utilizou-se um microscópio *Olympus BX40* com objectiva de 100x. A gametocitémia e a taxa de parasitémia foram calculadas tendo em conta o número de gametócitos e o número de eritrócitos parasitados, respectivamente, em relação ao número total de eritrócitos presentes em cada campo microscópico.

Quando a parasitémia atingiu valores entre os 10 e 20% e os gametócitos a exflagelar, estes murganhos foram utilizados para infectar mosquitos. A observação de exflagelação dos microgametócitos permite confirmar a presença de gametócitos infectantes no sangue periférico e que o parasita está assim apto para iniciar o desenvolvimento esporogónico no interior do mosquito. Para a detecção da exflagelação dos parasitas, retirou-se uma gota de sangue da veia da cauda, bafejou-se para simular as condições de pH no interior do mosquito e fez-se a observação microscópica com a objectiva de 40x. Só nos casos em que foi confirmada a exflagelação dos parasitas, é que se prosseguiu com alimentação dos mosquitos.

2.3.2 – Efeito da inibição química das Transglutaminases do mosquito durante a infecção por *Plasmodium berghei*

Mosquitos fêmeas da espécie *Anopheles stephensi* com 3 a 4 dias foram anestesiados no frio e inoculados intratoraxalmente com 69 nl de 154 μ M D003 (1,3-Dimetil-2 [(2-oxopropil)tio]imidazolium cloridessolution) (N-Zyme Bio Tec GmbH, Darmstadt, Alemanha) ou com o mesmo volume solução de diluição (0,05% DMSO) usando o micro-injector Nanoject (Drumond Scientific). Dezoito horas após o tratamento os mosquitos foram experimentalmente infectados com *P. berghei*, como descrito em 2.3.1. Foram feitas três experiências independentes. Dez dias após à infecção, foram extraídos os intestinos médios e determinado a taxa de infecção e a intensidade da infecção.

2.3.3 – Efeito do silenciamento dos genes que codificam para a Transglutaminase AGAP009097 e AGAP009098 durante a infecção por *Plasmodium berghei*

2.3.3.1 – Síntese de RNA de cadeia dupla (dsRNA)

Foram amplificados por PCR um fragmento dos genes AGAP009097 e AGAP009098 respectivamente. A reacção de PCR foi realizada em 30 μ l mistura de reacção, contendo 1 μ l de amostra DNA, 10x tampão de PCR (Promega), 1,5 mM de $MgCl_2$, 200 μ M de dNTP, 0,5 μ M de cada primer (tabela 4), Taq 1U e H_2O ultra-pura perfazendo um volume de 30 μ l. Para controlo da especificidade do silenciamento foi utilizado dsRNA do gene murino de β -2-microglobulina (b2m).

Tabela 4 – Combinação dos primers utilizados nas várias misturas de reacção da PCR e posterior síntese de dsRNA.

<i>primers</i>	<i>gDNA bp</i>
TGM097-ds-fwd + TGM097-ds-rev	1380
TGM098-ds-fwd + TGM098-ds-fwd	1097
dsb2m –ds- fwd + dsb2m-ds- rev	336

As condições da reacção de PCR consistiram em 38 ciclos de amplificação, após uma desnaturação inicial a 94°C durante 3 minutos. Cada ciclo com as seguintes fases: a 94°C durante 30 segundos para desnaturação das cadeias de DNA, a 62°C durante 30 segundos promovendo a ligação dos primers ao DNA molde – annealing e a 72°C durante 90 segundos para extensão. Sucedeu-se um período de extensão final a 72°C durante um minuto. A reacção de PCR foi efectuada no termociclador da marca Biometra, modelo TGradiente.

O material assim obtido foi purificado de acordo com o kit da SureClean, também utilizado na purificação do material de DNA genómico (ver descrição anterior, em 2.2.4.). Seguiu-se a síntese de dsRNA.

A síntese dsRNA foi feita de acordo com as instruções do fabricante para o kit Megascript, Ambion. Resumidamente, preparou-se uma mistura de 30 µl, contendo 10x tampão de reacção, água ultra pura, ATP, CTP, GTP, UTP, enzima de reacção e cDNA. Misturou-se bem e incubou-se durante a noite a 37°C. No dia seguinte adicionou-se 1 µl de DNase I e misturou-se bem, voltando a incubar a 37°C durante mais 15 minutos.

O dsRNA resultante foi extraído com fenol-clorofórmio e precipitado com isopropanol. À mistura anterior foi adicionado 115 µl de água ultra pura e 15 µl de acetato de amónia para parar a reacção e misturou-se bem. Foi feita a extracção adicionando o mesmo volume de fenol-clorofórmio ao tubo, isto é, 163 µl. Centrifugou-se durante 15 minutos a 4°C a 14000 rpm e retirou-se o sobrenadante para um novo tubo. Repetiu-se o procedimento, desta vez com 80 µl de clorofórmio.

Adicionou-se 50 µl de isopropanol, misturou-se e deixou-se a mistura a -20°C durante 15 minutos. Voltou-se a centrifugar durante 15 minutos a 4°C a 14000rpm. Retirou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o dsRNA em 40 µl de água ultra-pura. Guardou-se a -70°C.

2.3.3.2 - Silenciamento dos Genes AGAP009097 e AGAP009098

Três grupos de mosquitos *A. gambiae* s.s. *estirpe Yaoundé* com 5 a 6 dias de idade e mantidos nas mesmas condições que os utilizados para caracterização dos genes da transglutaminase, foram utilizados para o silenciamento dos genes. Os

mosquitos foram anestesiados no frio e inoculados intratoraxalmente com 69 nl da solução de dsRNA usando micro-injector Nanoject (Drumond Scientific). No primeiro grupo foi injectado 17 µg dsRNA para o gene AGAP009097, no segundo 17 µg de dsRNA do gene AGAP009098 e um grupo controlo, recebeu 17 µg de dsRNA correspondente a b2m murina. Para verificar a eficiência do silenciamento, imediatamente antes da infecção experimental, 4 dias após a injeção foram colectados 30 mosquitos. Estes foram imobilizados pelo frio, colocados em solução de etanol 90% e, por fim, numa solução PBS tratada com dietilpirocarbonato (DEPC, Sigma). Posteriormente colocaram-se os mosquitos numa lâmina de vidro e contendo uma gota de PBS e, com ajuda de uma lupa estereoscopia *Olympus Highlight 2000* e duas agulhas de dissecação colheram-se os intestinos médios e os corpos gordos. O material foi recolhido para tubos de centrífugas de 2ml contendo 50 µl de RNA Later (Ambion), foram guardados a -20°C. Dias depois, foram utilizados para extracção de RNA, seguidos da síntese de cDNA e quantificação do silenciamento através do RT-PCR.

2.3.3.3 – Infecção dos mosquitos com *P. berghei*

Os restantes mosquitos foram alimentados naturalmente, através de picadas, em murganhos previamente infectados com *P. berghei* anestesiados com uma solução de Imalgene diluído em PBS (100 mg/Kg) e colocados no topo das gaiolas. Após a alimentação foram retirados os mosquitos não alimentados e os restantes foram mantidos a uma temperatura entre os 19 e os 21°C, 12 horas luz/escuro e com glucose (Merck) a 10% enriquecida com PABA (Sigma) a 0,05%. Passados 11 dias após a infecção, os intestinos médios foram dissecados, colocados numa gota de PBS entre a lâmina e a lamela e procedeu-se à contagem do número de oocistos por visualização óptica com uma objectiva de 40x.

2.3.3.4 – Perfil de transcrição dos genes AGAP009097 e AGAP009098 durante a infecção por *Plasmodium berghei*

Cerca de 200 mosquitos (100 mosquitos em cada gaiola) foram alimentados naturalmente em murganhos. Para alimentação numa gaiola utilizou-se murganhos infectados com *P. berghei* e para outro murganho não infectado (como

descrito no ponto 2.3.3.3). Passadas 24h após a alimentação sanguínea – fase em que os oocinetos de *P. berghei* invadem o epitélio do intestino médio do mosquito, foram dissecados 30 intestinos médios e 30 corpos gordos de cada grupo. Os tecidos foram recolhidos para tubos de centrífugas de 2ml com 50 µl de RNA Later (Ambion), foram armazenados a -20°C. Os restantes mosquitos foram mantidos nas mesmas condições e passados 11 dias foram utilizados para a detecção dos oocistos, seguindo os mesmos procedimentos descritos anteriormente.

2.3.3.5 - Extracção de RNA

A extracção do RNA foi feita seguido o mesmo protocolo e procedimentos anteriormente descritos (2.2.7). Estas amostras de RNA foram utilizadas para sintetizar cDNAs, de acordo com o kit da Promega descrito anteriormente (no ponto 2.2.8). Após a obtenção do cDNA procedeu-se à realização do RTPCR

2.3.3.6- RT-PCR em tempo real

Para a quantificação da expressão génica por RT-PCR em tempo real (QRT) utilizou-se o cDNA sintetizado a partir de transcrição reversa (RT) de RNA, para a amplificação da reacção de PCR e para detecção do produto de amplificação utilizou-se a molécula SYBR Green, que ao intercalar-se na cadeia dupla de DNA, emite fluorescência e permite a detecção do sinal durante a progressão do PCR, reflectido assim a quantidade de DNA amplificado em cada ciclo.

2.3.3.7 - Construção da curva-padrão

A curva-padrão foi efectuada a partir de diluições seriadas de DNA de modo a calcular a eficiência de reacção de PCR e determinar quais as melhores condições de reacção. Foi utilizado a mesma curva como referência para a quantificação relativa dos níveis expressão. A partir de uma concentração de 100 ng/µl de gDNA, fez-se diluições seriadas de 10^1 , 10^0 , 10^{-1} , e 10^{-2} .

2.3.3.8 – Condições da reacção de PCR em tempo real

As reacções de PCR foram efectuadas com o kit IQ™ SYBR® Green Super Mix da Biorad num termociclador *iCycler iQ™* (Bio-Rad laboratories).

Preparou-se uma mistura de 20 µl, contendo 10 µl de 2x supermix Sybergreen, com 0,3 µM de primer Fwd e Rev, 9,76 µl de água ultra pura e 1 µl de cDNA. As sequências dos primers utilizados nestas experiências foram TGM98RT-Fwd (5'-GCCATATCGCTCGTCTTAGC-3') e TGM098RT-Rev (5'-CCGTTAGGCCATCCTCATTA-3'). Foi utilizado o gene da proteína ribossomal S7 (Salazar et al., 1993) como controlo interno (S7-F: 5'-CCTGGAGCTGGAGATGAACT-3') e S7-R: (5'-CGGCGCTCGGCAATGAACAC-3'). As condições de PCR foram: um ciclo inicial de desnaturação a 95°C durante 10 min, seguido de 40 ciclos de 95°C durante 15 segundos e 60°C durante um minuto.

2.3.4 – Análise estatística dos Resultados

Foram comparados as taxas de infecção entre os diferentes grupos utilizando o teste de Fisher. A intensidade de infecção e os níveis de expressão dos genes que codificam para as transglutaminases foram comparados utilizando o teste de Mann-Whitney. As análises estatísticas foram efectuadas utilizando o programa informático SPSS 16.0 - **S**tatistical **P**ackage for the **S**ocial **S**ciences. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas para valores de $p < 0.05$.

III – RESULTADOS

3.1 - Caracterização dos genes que codificam transglutaminases

A transglutaminase enzima que actua como catalisadora de reacções de ligações entre proteínas, desempenha um papel importante no sistema imune do mosquito, pelo que se decidiu estudar e melhor compreender a sua função. Para tal, foram estudados dois genes que a codificam: a AGAP009097 e AGAP009098. Procedeu a purificação do material resultado do PCR, foi feito uma electroforese a confirmar o material purificado (fig. 8), quantificação e posterior sequenciação destes genes.

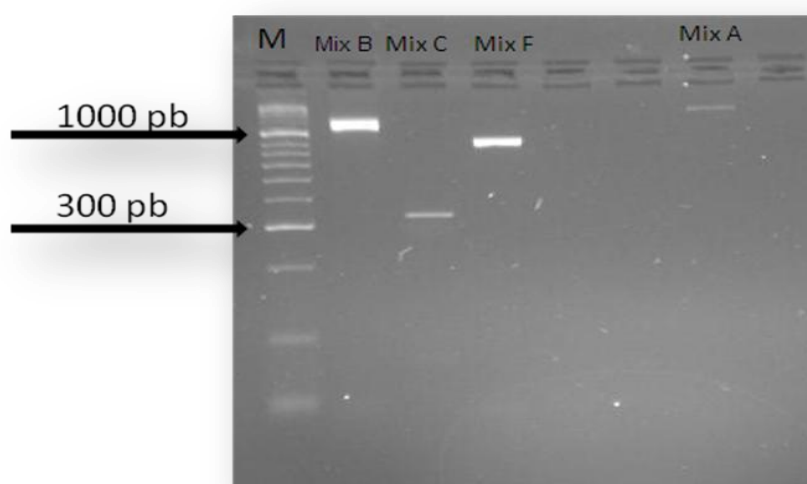



Fig. 8- Exemplo de uma electroforese dos produtos de PCR obtidos com as diferentes combinações de primers utilizados na caracterização dos genes AGAP009097 e AGAP009098. M – marcador de peso molecular, HypeLadder II da Bioline. Mix A 1097 pb; Mix C 336pb; Mix F 854pb e Mix A 1380 pb.

Durante este trabalho, foi possível sequenciar toda a zona dos genes que codificam para a transglutaminase. É de realçar que o gDNA sequenciado é da espécie *A. gambiae* estirpe Yaoundé, pelo que tais sequências obtidas foram comparadas com as de AgamP3 já descritas, e disponíveis na base de dados (<http://www.ensembl.org/>).

O primeiro gene AGAP009097 é constituído por 810 pares de bases de transcritos, codifica 2 exões – o E032630 e E032631 que serão traduzidos em 143 aminoácidos. Por sua vez o AGAP009098 é constituído por 783 pares de bases, que codificam 246 resíduos de proteínas em 3 exões E032632, E032633 e E032634.

110 120 130 140 150 160 170 180 190 200
TCCGCCNTTTCACACANTCATTCTGCAGACCTTTGAGAAATGAGATCGATCATGAGCCNTCGGCCGAACCTAACGATTGAAAGAATCGACACCTGTCTAGAC



Por sua vez o gene o AGAP009098 apresentou mais locais polimórficos, num total de 24. Destes, não foi possível distinguir qual o nucleótido em 3 deles.

Não foi possível confirmar a estrutura do gene AGAP009098 devido à má qualidade das sequências obtidas, apesar das diversas repetições efectuadas.

```

      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      10          20          30          40          50          60          70
AGAP009097 GATCGAGTGT TCGGGATTGT GCAAGAGTCT CACCATTCCG GTAATTATTG GAGAACGATC GTTCTTCTAA
MIX_D-GDNA GCAAGAGTCT CACCATTCCG GTAATTATTG GAGAACGATC GTTCTTCTAA
MIX_D-CDNA GCAAGAGTCT CACCATTCCG ~~~~~~ ~~~~~~ ~~~~~~

      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      80          90          100         110         120         130         140
AGAP009097 GCTTCTATTT ACTAAAGCAT ATCCCTATGC TGATTACTTT CAGATTGAGT TTGTTGACGC GAGGGACAAG
MIX_D-GDNA GCTTCTATTT ACTAAAGCAT ATCCCTATGC TGATTACTTT CAGATTGAGT TTGTTGACGC GAGGGACAAG
MIX_D-CDNA ~~~~~~ ~~~~~~ ~~~~~~ ~~~~~~ ~~~~~~ ~~~~~~ ~~~~~~ATTGAGT TTGTTGACGC GAGGGACAAG

      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      150         160         170         180
AGAP009097 TGTGAAGTCA CCTTCCTGAT TCGACCCTCG TTCAAGGGAA GCACTC
MIX_D-GDNA TGTGAAGTCA CCTTCCTGAT TCGAC
MIX_D-CDNA TGTGAAGTCA CCTTCCTGAT TCGAC

```

37

3.2 - Caracterização do papel da enzima da transglutaminase durante a infecção com *Plasmodium berghei*

3.2.1- Caracterização da expressão das transglutaminases AGAP009097 e AGAP009098 no estômago e corpo gordo.

Foram feitas três experiências independentes em que os mosquitos *A. gambiae* foram alimentados em ratos da espécie *Mus musculus* previamente infectados com *P. berghei*. Às 24 horas após a infecção, que é tempo em que o parasita atravessa o epitélio do intestino médio e se irá diferenciar em oocistos, procedeu-se á dissecação dos intestinos médios. Dez dias após a infecção cotaram-se os oocistos, para avaliar a infecção. Foram dissecados 126 mosquitos tendo uma taxa de infecção média para as 3 experiências de 88,8%, com um número médio de 96 oocistos por intestino médio (tabela 5).

Tabela 5 - Taxa de infecção determinada em mosquitos *A. gambiae* alimentados em murganhos infectados com *P. berghei*

Experiência	Nº de mosquitos Dissecados	Infectados	Nº médio de Oocistos	Taxa de infecção (%)
1	41	30	71	73,2
2	40	35	68	85,7
3	45	36	133	80,0
Total	126	101	94	80,2

A taxa de infecção variou entre os 73,2,2% na primeira experiência e os 85,7% na segunda, tendo sido verificado um valor intermediário de 80,0% na terceira experiência. O número médio de oocistos oscilou entre os 68 na segunda experiência e os 133 na terceira, tendo verificado na primeira um número médio de 71 oocistos por estômagos dissecados.

Para caracterizar a expressão das transglutaminases AGAP009097 e AGAP009098 no estômago e corpo gordo, procedeu-se á realização da técnica de PCR quantitativo em tempo real. Uma técnica sensível que quantifica a transcrição e pequenas mudanças na expressão dum gene. Esta técnica simples de detecção dos novos produtos de PCR em tempo Real, utiliza o SYBR Green I, fluorescência que se vai ligar á subunidade menor da cadeia dupla de DNA.

Há duas técnicas de quantificação do produto de RT-PCR em tempo real: quantificação relativa baseada em na expressão relativa do gene em estudo versus um gene de referência e a quantificação absoluta baseada na calibração da curva (Pfaffl 2001). Neste trabalho utilizou-se o método de comparativo C_T para quantificação relativa que descreve a mudança na expressão de um gene alvo em relação a um grupo de referência, ou a um grupo controlo (Livak and Schmittgen, 2001).

O método comparativo é um método semelhante ao método relativo da curva padrão, excepto pelo facto de neste último, a quantificação de todas as amostras experimentais é determinada a partir da curva padrão e dividida pela quantidade do calibrador, enquanto no método C_T usa-se uma fórmula aritmética para calcular o mesmo resultado para quantificação relativa (Applied Biosystems, 2005). Usando o método comparativo C_T com o RT-PCR, pode-se normalizar para uma referência endógena usando os dados gerados durante a experiência de PCR.

Em cada ensaio, a expressão foi determinado como a média de 3 réplicas para o gene 98 e para o gene referência, o S7. Foi feita uma curva padrão para o S7 de modo a confirmar a sua expressão e a referida temperatura de dissociação dos produtos amplificados (fig 11 e 12) Calculou-se o ΔC_T , o $\Delta\Delta C_T$ e a quantidade relativa do gene 98 em relação ao gene referência, o S7.

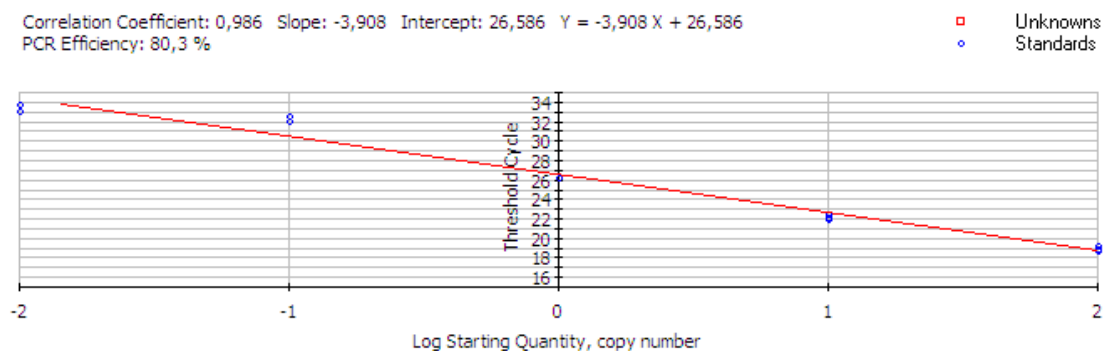


Fig. 11 - Gráfico dos resultados da amplificação por RT-PCR em tempo real da curva padrão.

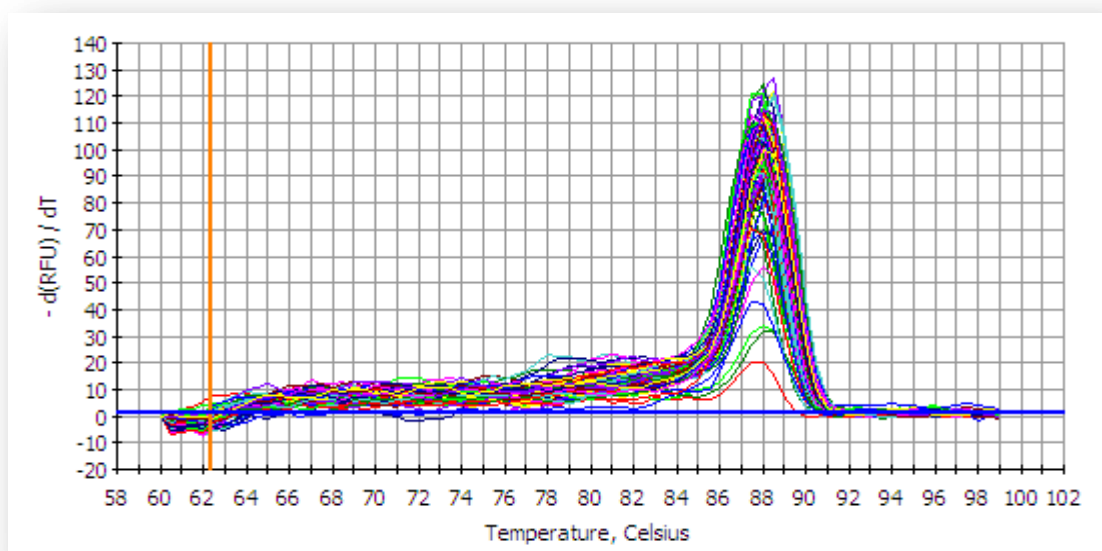


Fig. 12 - Exemplo das curvas de dissociação dos produtos amplificados para o gene S7, gene utilizado como referência para normalização dos dados. Está representada a primeira derivada negativa da variação de fluorescência em função da temperatura.

O estudo da expressão génica foi feita apenas para o gene AGAP009098, porque após várias tentativas não foi possível conseguir uma boa curva para os primers da RT-97, pelo que se optou apenas por trabalhar com o gene AGAP009098.

Com isso, foi possível após a extracção do RNA a partir de estômagos e corpo gordo dos mosquitos, sintetizar o cDNA e posterior reacções RT-PCR em tempo real.

Os dados mostraram que a expressão do gene AGAP009098 está aumentada nos mosquitos alimentados em murganhos infectados quando comparados com os alimentados em murganhos não infectados. Após a quantificação relativa deste gene, verificou-se um aumento médio de 3,75 vezes para o corpo gordo e 3,71 para os estômagos. Este aumento não é estatisticamente significativo. Na figura 13 está representada a expressão relativa do gene nos mosquitos infectados em função dos não infectados.

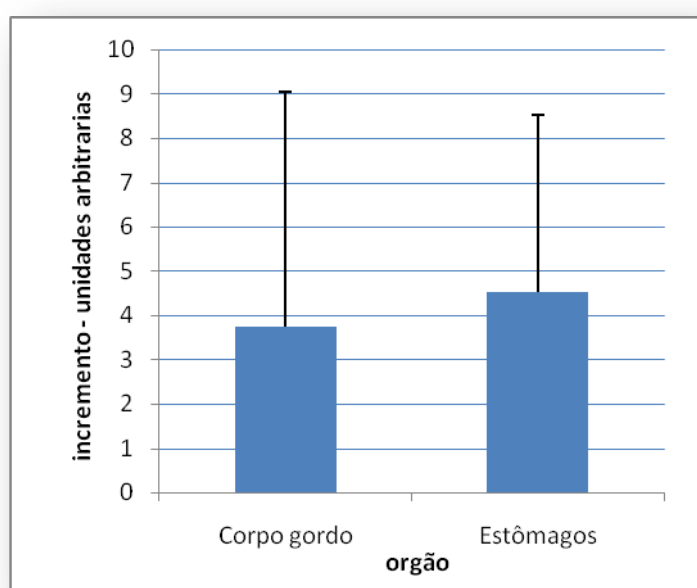


Fig. 13 - Aumento relativo do valor médio da expressão do gene AGAP009098 no intestino médio e corpo gordo de mosquitos alimentados em murganhos infectados em comparação com os alimentados em ratos não infectados.

3.2.2 - Efeito da inibição química das Transglutaminases do mosquito durante a infecção de *Plasmodium berghei* em *Anopheles stephensi*

De modo a compreender melhor a interacção entre o parasita e o vector, e de uma forma em particular, com o objectivo de estudar o papel do gene da transglutaminase foram feitas experiências (Capítulo 3.2), em que se injectou o inibidor D003 em mosquitos *A. stephensi* e 18h depois foram alimentados,

naturalmente em ratos infectados. Quando ao décimo dia se procedeu á dissecação dos intestinos médios para contagem dos oocistos, verificou-se um aumento significativo da taxa de infecção nos grupos experimentais quando comparados com os grupos controlo de 64,9% para 83,5% em relação aos grupos controlos (Figura 14).

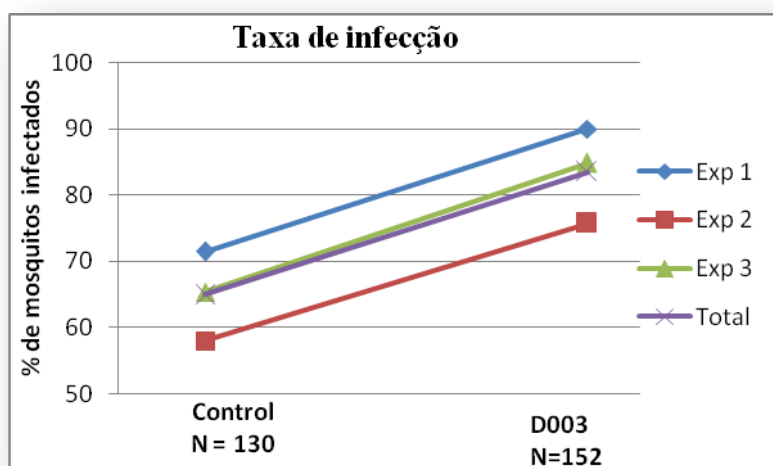


Fig. 14 – Análise das taxas de infecção *A. stephensi* com *P. berghei*

Para a experiência 1 foram dissecados 40 mosquitos tratados com D003, dos quais 36 encontravam-se infectados e dos 28 controlos, 20 estavam infectados. A taxa de infecção aumentou de 71,4% no grupo controlo para 90% no grupo tratado com D003, assim como o número médio de oocistos por intestino médio, que passou de 109 para 160. Na experiência 2, também se verificou o aumento da taxa de infeção que passou de 58% para 75,8%, e o aumento de número médio de oocistos, neste caso de 86 para 194. E por fim, na experiência 3, a tendência manteve-se, isto é o aumento da taxa de infecção de 65,4% para 84,8%, assim como o aumento das médias dos oocistos que passou de 56 para 83 (Figura 15).

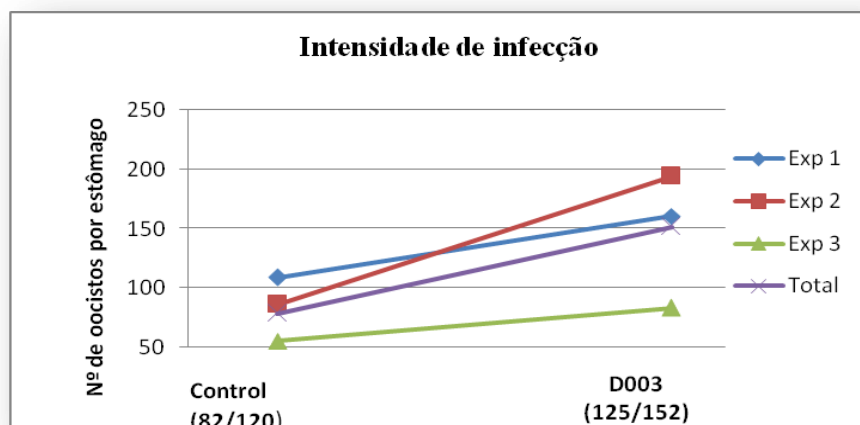


Fig. 15 – Intensidade de infecção de *A. stephensi* com *P. berghei*. Definida como o número médio de oocistos por intestino médio de mosquito.

No total houve um incremento a taxa de infecção de 23,3 sendo verificado maior valor de incremento da infecção na experiência 3, de 25,2.

As taxas de infecção entre o grupo controlo e mosquitos tratados com D003 foram comparadas utilizando o teste de Fisher. Para todas as experiências obteve-se um valor de $p < 0,05$, o que significa que as taxas de infecção não são iguais entre os dois grupos.

Calculou-se também o incremento do número de oocistos, e concluiu-se que neste caso a experiência 2 foi onde se verificou um maior incremento, 125,6. Para o total das experiências o valor de incremento foi de 93,6. Aplicou-se o teste de Man-Whitney para fazer a comparação dos números de oocistos entre o grupo controlo e mosquitos tratados com D003 e concluiu-se que os números de oocistos por intestino médio não são iguais. Com excepção da experiência 1 em que o valor p foi superior a 0,05 (0,378). (Consultar resultados da tabela 6 em anexo 2).

3.2.3- Silenciação do gene usando dsRNA

Para fazer o silenciamento dos genes que codificam para a transglutaminase, AGAP009097 e AGAP009098, foi sintetizado dsRNA *in vitro* que foi posterior injeção em mosquitos *A. gambiae*. Passados 2 dias, foram dissecados alguns mosquitos para verificar o silenciamento e os outros foram alimentados em murganhos infectados. Onze dias após a alimentação fez-se a contagem do número

de oocistos por intestinos médios e verificou-se que de uma maneira geral, nos mosquitos em que foi feito o silenciamento dos genes, houve um aumento da taxa de infecção em relação ao grupo controlo em que foi utilizado dsRNA b2m. Das duas experiências realizadas, para um total de 288 mosquitos, em que 63 serviram como controlo, 113 foram injectados dsRNA para o gene AGAP009097 e 112 dsRNA para AGAP009098. A taxa de infecção passou de 63,9% para 79,2 no grupo em que o gene AGAP009097 foi silenciado e 77,3 para o grupo em que o gene AGAP009098 foi silenciado (fig. 16), verificando a mesma tendência em relação á intensidade de infecção (fig. 17).

Também se verificou o incremento de infecção nestas experiências que foi de 23,9 para os mosquito KD97 e 29,2 para os KD98, isto analisando o total das experiências. O incremento do número de oocistos foi 79,4 para KD97 e 77,8 para o KD98. Embora se tenha observado em todas as experiências um aumento na taxa de infecção, as diferenças observadas entre os mosquitos KD97 e KD98 e o grupo controlo não foram estatisticamente significativas. As diferenças entre intensidades de infecção foram analisadas através do teste de Mann-Whitney que mostrou que as diferenças eram estatisticamente significativas entre o grupo controlo e o grupo KD97, embora para o grupo KD98 estas diferenças não foram significativas (tabela 7, anexo 2).

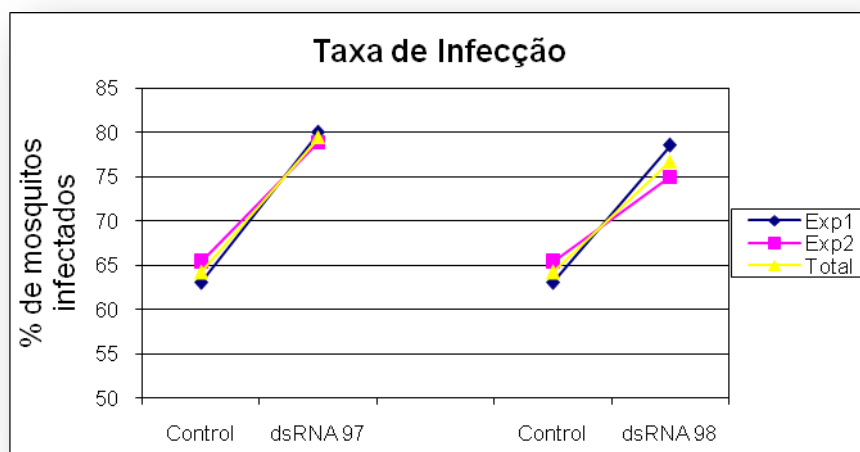


Fig. 16 – Análise das taxas a infecção de *P. berghei* em mosquito tratados com dsRNA para os genes AGAP009097 e AGAP009098.

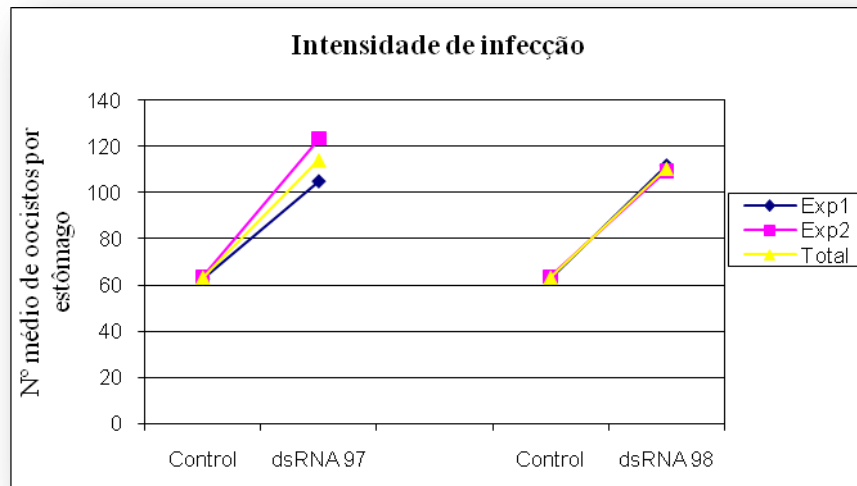


Fig. 17 – Análise da intensidade de infecção de *P. berghei* em mosquito tratados com dsRNA para os genes AGAP009097 e AGAP009098.

Como o objectivo de verificar se o gene AGAP009097 e AGAP009098 estavam silenciados efectuou-se qRT-PCR para quantificar a expressão destes genes após o silenciamento, imediatamente antes da infecção. Não foi possível confirmar este silenciamento conforme proposto inicialmente.

IV-DISSCUSSÃO

4.1- Caracterização dos genes que codificam transglutaminases

O combate à malária tem merecido especial atenção em todo mundo devido ao elevado número de casos registados anualmente e com tendência a aumentar apesar de todo o esforço feito. Com as mudanças ambientais, ressurgimento de novas doenças e a resistência às insecticidas e antimaláricos, é preciso investigar novas alternativas e estratégias de controlo que requerem a compreensão da interacção entre o parasita e o hospedeiro e a interacção entre o parasita e vector e como estas interacções regulam a capacidade de transmissão dos mosquitos.

Durante o desenvolvimento do parasita no vector, o mosquito possui mecanismos eficientes capazes de eliminar a maior parte dos parasitas, reduzindo-os até cerca de 90 a 99% durante a invasão do epitélio e uma grande parte durante a invasão das glândulas salivares. Neste processo de eliminação e consequente redução do número de parasitas, estão envolvidos vários mecanismos do sistema imunológico do mosquito, e a coagulação mediada por transglutaminases faz parte deste sistema. Esta enzima, a transglutaminase, além de facilitar várias funções celulares, também funciona como mediador das vias de transdução de sinais que estão envolvidos na regulação da apoptose (Adini et al., 2001) Pelo que se revela da maior importância estudos sobre esta enzima e as suas funções nas respostas imunes do mosquito.

O genoma de *A. gambiae* foi descrito em 2002 por Holt et al., a partir do estirpe PEST (AgamP3) tendo conseguido sequenciar 278 milhões de pares de base. Noventa e um por cento do genoma foram organizados em 303 grupos tendo o maior 23.1 milhões pares de base. Análises destas sequências genómicas revelam evidências de existência de cerca de 14000 proteínas transcricionais. Algumas das quais estão envolvidas nos processos de adesão celular e imunidade (Holt et al., 2002).

Neste trabalho a sequenciação foi feita apenas para os genes AGAP009097 e AGAP009098 que codificam para a transglutaminase uma vez que já existem as sequências dos genes que codificam a enzima na sua totalidade. Verificou-se a

presença de locais polimórfico, o que é justificado pelo facto de ter sido usado a estirpe *Yoaundé* em comparação com a estirpe Agamp3, utilizada para o projecto de sequenciação do genoma. Esta estirpe foi produzida por cruzamentos num laboratório a partir de uma outra estirpe originária da Nigéria. A estirpe inicial foi recolhida na zona da baía de Asembo em Quénia Ocidental, e reselectionado tendo em conta o fenótipos cor dos olhos, cor-de-rosa (Holt et al 2002), enquanto a estirpe A *Yoaundé* utilizada neste trabalho é uma estirpe mantida no insectário do CMDT/IHMT, há já algum tempo, e é uma linhagem proveniente dos Camarões.

Dos 5 exões codificados por estes dois genes e que inicialmente foram propostos como objectivos de sequenciação e estudo, não foi possível confirmar a estrutura do gene 98. Foram feitas várias sequências, no entanto os resultados não foram os esperados, pelo que só se apresentou os resultados correspondentes ao codão do 97.

4.2- Caracterização do papel da enzima da transglutaminase durante a infecção com *Plasmodium berghei*

O sistema de defesa inato do insecto representa um potencial obstáculo à sobrevivência e ao crescimento de microrganismos e parasita, em particular aqueles que, como o *Plasmodium* desenvolvem mudanças profundas associadas com invasão de múltiplos tecidos do hospedeiro. A sua transmissão exige que o intestino médio do vector forneça um ambiente permissível para reprodução sexual e diferenciação, translocação, e eventos da multiplicação que conduzem à formação dos esporozoitos. Igualmente exige a sobrevivência enquanto atravessam o hemocélio e especificamente coloniza as células da glândula salivar, onde adquirem a capacidade de infectar vertebrados. Os parasitas bem sucedidos podem contornar mecanismos de defesa do vector durante o processo de desenvolvimento, em várias formas: pelo reconhecimento do tipo de resposta e suprimindo esta resposta, ou com a insensibilidade às moléculas efectores (Richman et al., 1997).

A. gambiae suporta o desenvolvimento de *P. berghei*, apesar de este sistema parasita-vector nunca ocorrer na natureza. As circunstâncias do laboratório usadas para o desenvolvimento do parasita nos mosquitos envolvem um grande número gametócitos e geralmente levam à formação de um número elevado de oocistos na parede do intestino médio do mosquito. Ao contrário do que acontece com *P. falciparum*, em que um número reduzido de oocistos consegue desenvolver no intestino médio dos anofelinos, mesmo quando um mosquito ingere um grande número gametócitos (Tahar et al., 2002). Apesar de algumas diferenças descritas entre a infecção por estes 2 parasitas a resposta poderá ter muitos pontos em comum (Becker et al., 2004; Vlachou et al., 2004; Dong et al., 2006b). Como o sistema *A. gambiae*-*P. berghei* é mais fácil de usar e com menos problemas ao nível de segurança laboratorial tem sido o mais utilizando, tendo sido escolhido para o presente trabalho.

Neste trabalho a taxa de infecção foi determinada contando o número de oocistos por estômagos, 11 dias após a alimentação dos mosquitos, verificando um aumento da taxa de infecção nos mosquitos em que os genes AGAP009097 e AGAP009098 foram silenciados confirmando de um modo menos evidente os resultados obtidos através da inibição enzimática das transglutaminases. Embora tenha sido visível um aumento do número de oocistos, não foi possível confirmar por qRT-PCR o silenciamento, o que se poderá dever à eficiência obtida na reacção de PCR em tempo real.

Experiências realizadas com RNA de interferência e silenciamento de exões específicos de determinados genes relacionados com o sistema imune dos mosquito, demonstram um efeito pleiotrófico destes genes, influenciando assim a intensidade de infecção dos mosquitos, como é o caso do TEP1 em que o KD deste gene *in vivo* em dois estirpe diferentes de *A. gambiae* suprime o processo de encapsulação dos oocinetos aumentando assim susceptibilidade a *P. berghei* (Chen et al., 2008).

Após a passagem do epitélio do intestino médio o parasita entra em contacto com componentes solúveis da hemolinfa, que reconhecem e se ligam ao oocineto causando a morte aos parasitas. Neste processo intervêm as enzimas da transglutaminase relacionadas com a coagulação da hemolinfa. Durante o funcionamento normal destas enzimas fazem o “crosslink” do fibrinogénio em polímeros de fibrina, que por sua vez vai participar na coagulação da hemolinfa e consequente eliminação dos parasitas. Alterando o funcionamento da transglutaminase esta deixa de desempenhar a sua função resulta num aumento de susceptibilidade ao parasita da malária. Os resultados obtidos demonstram esta alteração.

V- CONCLUSÃO

O sistema imune do mosquito responde á presença do parasita e pode ser considerado que a interacção entre os dois influencia a transmissão da malária. Há uma relação complexa entre estes dois organismos no que se refere ao processo das respostas imunes e tendo conhecimento destas respostas e dos componentes moleculares que estão envolvidos neste processo, pode-se manipular esta interacção.

Neste estudo, observou-se um aumento da susceptibilidade á infecção dos mosquitos *Anopheles gambiae* em resultado do silenciamento dos genes da transglutaminase, enzima que influencia o desenvolvimento de *Plasmodium berghei*. Apesar de os resultados não serem muito esclarecedores, uma vez que os resultados do silenciamento não foram confirmados por qRT_PCR e não se verificar esta interacção entre estas espécies de vector/parasita na natureza, estudos futuros deverão ser feitos com outras enzimas TGMs que interferem nas respostas imunes do vector e noutras espécies de modo a compreender o papel destas enzimas e deste modo contribuir para a redução dos casos de malária que se registam a nível mundial.

VI - BIBLIOGRAFIA

Abrantes P, Lopes L, Rosário V and Silveira H (2005) – Effect of chloroquine on the expression of genes involved in the mosquito immune responses to *Plasmodium* infection. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **35**: 1124 – 1132.

Adini A and Warburg A (1999) – An interaction of *Plasmodium gallinaceum* ookinetes and oocysts with extracellular matrix proteins. *Parasitology*, **119**: 331-336.

Adini A, Krugliak M, Ginsburg H, Li L, Lavie L and Warburg A (2001) - Transglutaminase in *Plasmodium* parasites: activity and putative role in oocysts and blood stages. *Molecular & Biochemical Parasitology* **117**: 161–168.

Aeschlimann P and Grenard P (2006) - Transglutaminase Gene Products. *Journal of Biological Chemistry*, **10**: 380-533.

Agianian B, Lesch C, Loseva O, Mitchell S and Dushay MS (2007) - Preliminary characterization of hemolymph coagulation in *Anopheles gambiae* larvae. *Developmental & Comparative Immunology*, doi:**10.1016/j.dci.2006.12.006**.

Aguilar R, Das S, Dong Y and Dimopoulos G (2007) - Continuous exposure to *Plasmodium* results in decreased susceptibility and transcriptomic divergence of the *Anopheles gambiae* immune system. *BioMed Central Genomics* **8**:451. doi:10.1186/1471-2164-8-451.

Ayala J, Escalate A and Rich M (1999) – Evolution of *Plasmodium* and the recent origin of the world populations of *Plasmodium falciparum*. *Parasitology*, **41**: 55-68.

Baton L, Garver L, Xi Z and Dimopoulos G (2008) - Functional genomics studies on the innate immunity of disease Vectors. *Insect Science*, **5**: 15-27.

Becker K, Tilley L, Vennerstrom L, Roberts D, Rogerson S and Ginsburg H (2004) Oxidative stress in malaria parasite-infected erythrocytes: host-parasite interactions. *International Journal of Parasitology*, **34**: 163–189.

Beninati S and Piacentini M (2004) - The transglutaminase family: an overview: Minireview article. *Amino Acids*, **26**: 367–372.

Bidla G, Lindgren M, Theopold U and Dushay MS (2005) - Hemolymph coagulation and phenoloxidase in *Drosophila* larvae. *Developmental & Comparative Immunology*, **29**: 669 – 679.

Blandin S and Levashina E (2004) - Mosquito immune responses against malaria parasites. *Current Opinion in Immunology* **16**: 16–20.

Carlton J, Angiuoli S, Suh B, Kooij T, Perteu M, Silva J, Ermolaeva M, Allen J, Selengut J, Koo H, Peterson J, Pop M, Kosack D, Shumway M, Bidwell S, Shallom S, AkenS, Riedmuller S, Feldblyum T, Cho J, Quackenbush J et al., (2002) Genome sequence and comparative analysis of the model rodent malaria parasite *Plasmodium yoelii yoelii*. *Nature*, **419**: 512-519.

Certain L and Sibley C (2007) – *Plasmodium falciparum*: A novel method for analyzing haplotypes in mixed infections. *Exp. Parasitology* **115** (3): 233 – 241.

Chen M, Hu K. Huang C and Song Y (2005) - More than one type of transglutaminase in invertebrates? A second type of transglutaminase is involved in shrimp coagulation. *Developmental and Comparative Immunology*, **29**: 1003–1016.

Chen Y, Weng Z and Zheng L (2008) – In.nate immunity against malaria parasites in *Anopheles gambiae*. *Insect Science*, **15**: 45-52

Christophides G, Vlachou D and Kafatos F (2004) - Comparative and functional genomics of the innate immune system in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Immunological Reviews*, **198**: 127–148.

Christophides G, Zdobnov E, Barillas-Mury C, Birney E, Blandin S, Blass C, Brey P, Collins F, Danielli A, Dimopoulos G. et al. (2002) - Immunity-related genes and gene families in *Anopheles gambiae*. *Science*, **298**: 159 - 165.

Cohuet A, Krishnakumar S, Simard F, Morlais I, Koutsos A, Fontenille D, Mindrinos M and Kafatos F (2008) - SNP discovery and molecular evolution in *Anopheles gambiae*, with special emphasis on innate immune system. *BioMed Central* **9**:227 doi:10.1186/1471-2164-9-227.

Craig A, Kyes S, Ranson H and Hemingway J (2003) - Malaria parasite and vector genomes: partners in crime. *Trends in Parasitology* **19**(8) 356-362.

Dimopoulos G, (2003) - Insect immunity and its implication in mosquito–malaria Interactions – Minireview. *Cellular Microbiology*, **5** (1): 3–14.

Dimopoulos G, Casavant T, Chang S, Scheetz T, Roberts C, Donohue M, Schultz J, Benes V, Bork P, Ansorge W, Soares M, and Kafatos F (2000) - *Anopheles gambiae* pilot gene discovery project: Identification of mosquito innate immunity genes from expressed sequence tags generated from immune-competent cell lines. *Proceedings of the National Academy of Sciences – Genetics*, **97** (12): 6619–6624.

Dimopoulos G, Christophides G, Meister S, Schultz J, White K, Barillas-Mury C and Kafatos F (2002) - Genome expression analysis of *Anopheles gambiae*: Responses to injury, bacterial challenge, and malaria infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences – Immunology*, **99** (13): 8814-8819.

Dimopoulos G, Müller H, Levashina E and Kafatos F (2001) - Innate immune defense against malaria infection in the mosquito. *Current Opinion in Immunology*, **13**:79–88.

Dimopoulos G, Richman A, Mü H and Kafatos F (1997) - Molecular immune responses of the mosquito *Anopheles gambiae* to bacteria and malaria parasites. *Proceedings of the National Academy of Sciences – Immunology*, **94**: 11508–11513.

Dimopoulos G, Seeley D, Wolf A and Kafatos F (1998) - Malaria infection of the mosquito *Anopheles gambiae* activates immune-responsive genes during critical transition stages of the parasite life cycle. *The EMBO Journal*, **17** (21): 6115–6123.

Dong Y, Aguilar R, Xi Z, Warr E, Mongin E and Dimopoulos G (2006) - *Anopheles gambiae* immune responses to human and rodent *Plasmodium* parasite species. *PLoS Pathogens*, **2**(6): 513-525.

Dong Y, Taylor H and Dimopoulos G (2006) - AgDscam, a Hypervariable Immunoglobulin Domain-Containing Receptor of the *Anopheles gambiae* Innate Immune System. *PLoS Biology*. **4**(7): 1137-1146.

Eckert R, Sturniolo M, Broome A, Ruse M and Rorkez E (2005) – Transglutaminase function in epidermis. *Journal of Investigate Dermatology*, **124**: 481-492.

Feachem R and Sabot O (2008) - A new global malaria eradication strategy (Viewpoint) *Lancet Infectious Diseases* **371**: 1633–1635.

Fésus L and Szondy Z (2005) - Transglutaminase 2: in the balance of cell death and survival (Minireview). *Federation of European Biochemical Societies*, **579**: 3297–3302.

Folk J (1980) - Transglutaminases. *Annual Reviews Biochemistry* **49**: 517-531.

Gardner M, Hall N, Fung E, White O, Berriman M, Hyman R, Carlton J, Pain A, Nelson K, Bowman S, Paulsen I, James K, Eisen J, Rutherford K, Salzberg S, Craig A, Kyes S, Man-Suen Chan M, Nene V, Shallom S, Suh B et al., (2002) - Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature* **419**: 498-511.

Gillespie J, Kanost M and Trenczek T (1997) – Biological Mediators of Insect Immunity. *Annu. Rev. Entomology* **42**: 611-613.

Gjørup I, Vestergaard L, Møller K, Rønn A and Bygbjerg I (2007) – Laboratory indicators of the diagnosis and course of imported malaria. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, **39**: 707 – 713.

Greenwood B, Fidock D, Kyle D, Kappe S, Alonso P, Collins F and Duffy P (2008) - Malaria: progress, perils, and prospects for eradication. *The Journal of Clinical Investigation*, **118**: 1266–1276.

Gurarie D and McKenzie F (2006) - Dynamics of immune response and drug resistance in malaria Infection. *Malaria Journal* **5**:86. doi:10.1186/1475-2875-5-86.

Haine R, Rolff J and Siva-Jothy T (2006) - Functional consequences of blood clotting in insects. *Developmental & Comparative Immunology*. doi:10.1016/j.dci.2006.08.004.

Heard N, Holmes C, Stephens D, Hand D and Dimopoulos G (2004) - Bayesian coclustering of Anopheles gene expression time series: Study of immune defense response to multiple experimental challenges. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **102** (47): 16939–16944.

Hoffmann J (1995) – Innate Immunity of insects. *Current Opinion Immunology*, **7**: 4-10.

Hoffmann J, Reichhart J and Hetru C (1996) – Innate Immunity in higher insects. *Current Opinion Immunology*, **8**: 8-13.

Holt G, Subramanian M, Halpern A, Sutton G, Charlab R, Nusskern D, Wincker P, Clark A, Ribeiro J, Wides R, Salzberg S, Loftus B, Yandell M, Majoros W, Rusch D, Lai Z, Kraft C, Abril J, Anthouard V, Arensburger P, Atkinson P et al.

(2002) - The Genome Sequence of the Malaria Mosquito *Anopheles gambiae*. *Science*, **298**: 129 – 149.

Jiravanichpaisal P, Lee L and Söderhäll K (2006) - Cell-mediated immunity in arthropods: Hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization. *Immunobiology*, **211**: 213 – 236.

Kim S, Jeitner T and Steinert P (2002) - Transglutaminases in disease. *Neurochemistry International*, **40**: 85–103.

Knell A (1991) – Malaria - A publication of the Tropical Programme of the welcome trust. Oxford University Press.

Kurata S (2006) - Recognition and elimination of diversified pathogens in insect defense systems. *Molecular Diversity*, **10**: 599–605.

Lagerberg R (2008) - Malaria in Pregnancy: A Literature Review. *Journal of Midwifery & Women's Health*, **53**: 209 – 215.

Levashina A (2004) – Immune responses in *Anopheles gambiae*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **34**: 673-678.

Livak K and Schmittgen T (2001) – Analyses of Relative gene expression data using Real-Time Quantitative PCR and $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Method. *Methods*, **25**: 402 - 408.

Martinelli A, Cheesman S, Hunt P, Culleton R, Raza A, Mackinnon M and Carter R (2004) - A genetic approach to the de novo identification of targets of strain-specific immunity in malaria parasites. *Proceedings of the National Academy of Sciences – Genetics*, **102** (3): 814-819.

Noguchi K, Ishikawa K, Yokoyama K, Ohtsuka T, Nio N and Suzuki E - Crystal Structure of Red Sea Bream Transglutaminase (2001). *The Journal of Biological Chemistry*, **276** (15): 12055–12059.

Osta A, Christophides K, Vlachou D and Kafatos F (2004) - Innate immunity in the malaria vector *Anopheles gambiae*: comparative and functional genomics. *The Journal of Experimental Biology*, **207**: 2551-2563.

Pfaffl M (2001) – A new Mathematical model for relative quantification in Real-Time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, **29** (900): 2002 – 2007.

Philips R (2001) – Current Status of Malaria and Potential for Control. *Clinical Microbiology Reviews*, **14**: 208-226.

Rich S and Ayala F (2000) – Population structure and recent evolution of *Plasmodium falciparum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **97** (13): 6994 -7001.

Richman A, Dimopoulos G, Seeley D and Kafatos F (1997) - *Plasmodium* activates the innate immune response of *Anopheles gambiae* mosquitoes. *The EMBO Journal*, **16** (20): 6114 – 6119.

Roca-Feltrer A, Carneiro I and Schellenberg J (2008) - Estimates of the burden of malaria morbidity in Africa in children under the age of 5 years. *Tropical Medicine and International Health*, **13** (6): 771–783.

Rodrigues J, Agrawal N, Sharma A, Malhotra P, Adak S, Chauhan V and Bhatnagar R (2007) - Transcriptional analysis of an immune-responsive serine protease from Indian malarial vector, *Anopheles culicifacies*. *Biomed Central Molecular Biology* **8**:33 doi: 10.1186/1471-2199-8-33.

Salazar C, Mills-Hamm D, Kumar V and Collins H, (1993) - Sequence of a cDNA from the mosquito *Anopheles gambiae* encoding a homologue of human ribosomal protein S7. *Nucleic Acids Research* **21**(17): 4147.

Scherfer C, Karlsson C, Loseva O, Bidla G, Akira Goto A, Havemann J, Mitchell S, Dushay M and Theopold U (2004) – Isolation and Characterization of Hemolymph clotting factors in *Drosophila melanogaster* by Pullot method. *Current Biology*, **14**: 625 – 629.

Schmid-Hempel P (2005) – Evolutionary Ecology of Insect Immune Defenses. *Annual Reviews Entomology*, **50**: 529-551.

Service, M (2003) – Medical Entomology for Students (3rd Edition), Cambridge, University Press.

Shiao S, Whitten M, Zachary D, Hoffmann J and Levashin E (2006) - Fz2 and Cdc42 Mediate Melanization and Actin Polymerization but Are Dispensable for *Plasmodium* Killing in the Mosquito Midgut. *PLoS Pathogens*, **2**: 1152 – 1164.

Spielman A and D`Antonio M (2004) – O Mosquito. Uma História natural do mais persistente e cruel inimigo do home (1^a Edição). Editora Replicação Lda, Lisboa.

Tahar R, Christian Boudin C, Thierry I and Bourgouin C (2002) - Immune response of *Anopheles gambiae* to the early sporogonic stages of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *The EMBO Journal* **21** (24): 6673-6680.

Theopold U, Li D, Fabbri M, Schefer C and Schmidt O (2002) - The Coagulation of insect hemolymph - Review. *Cellular and Molecular Life Sciences* **59**; 363 – 372.

Theopold U, Schmidt O, Söderhäll K and Mitchell D (2004) - Coagulation in arthropods: defence, wound closure and healing. *Trends in Immunology*, **25** (6) 289 – 294.

Tosta C (2007) - Coadaptation and malaria control. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, **102**(3): 385-404.

Vlachou D, Schlegelmilch T, Christophides G and Kafatos F (2005) - Functional Genomic Analysis of Midgut Epithelial Responses in *Anopheles* during *Plasmodium* Invasion. *Current Biology*, **15**: 1185–1195.

Volz J, Osta M, Kafatos F and Müller H (2005) - The roles of two clip domain serine proteases in innate immune responses of the malaria vector *Anopheles gambiae*. *The Journal of Biological Chemistry*, **280** (40): 40161-40168.

Wasserman M, Marquez A, Urquiza M and Jimenez P (1999) - Increase of a Calcium Independent Transglutaminase Activity in the Erythrocyte during the Infection with *Plasmodium falciparum*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **94** (12008): 10-20.

Whitten M, Shiao A and Levashina E (2006) - Mosquito midguts and malaria: cell biology, compartmentalization and immunology. *Parasite - Immunology* **28**: 121–130.

WHO (2008a) – Global malaria control and elimination: report of a technical review. Geneva, World Health Organization.

WHO (2008b) - World malaria report 2008. “WHO/HTM/GMP/2008.1”. Geneva, World Health Organization.

WHO (2007) - Malaria Elimination. A field manual for low and moderate endemic countries. Geneva, World Health Organization.

WHO (2006) – Guidelines for the treatment of malaria. (who/htm/mal/2006.1108). Geneva, World Health Organization.

WHO 2005 – Susceptibility of *Plasmodium falciparum* to antimalarial drugs: Report on global monitoring: 1996-2004. (who/htm/mal/2005.1103). Geneva, World Health Organization.

Winter F, Edaye S, Huttenhofer A and Brunel C (2006) –Anopheles gambiae miRNAs as actor of defence reaction against *Plasmodium* invasion. *Nucleic Acids Researchs*, **35** (20): 6953 – 6962.

Yee V, Pedersen L, Trong I, Bishop P, Stenkamp R and Teller D (1994) – Three-dimensional structure of a transglutaminase: Human blood coagulation factor XII. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **91**: 7296-7300.

Zemskov E, Janiak A, Hang J, Waghray A and Belkin A (2006) - The role of tissue Transglutaminase in cell-matrix interactions. *Bioscience*, **11**: 1057-1076.

Zou Z, Lopez D, Kanost M, Evans J and Jiang H (2006) - Comparative analysis of serine protease-related genes in the honey bee genome: possible involvement in embryonic development and innate immunity. *Insect Molecular Biology*, **15** (5): 603–614.

- (i) http://www.ensembl.org/Anopheles_gambiae/index.html - consultado em Outubro 2007

VII- Anexo

Sequências dos genes AGAP009097 e AGAP009098 da Transglutaminase

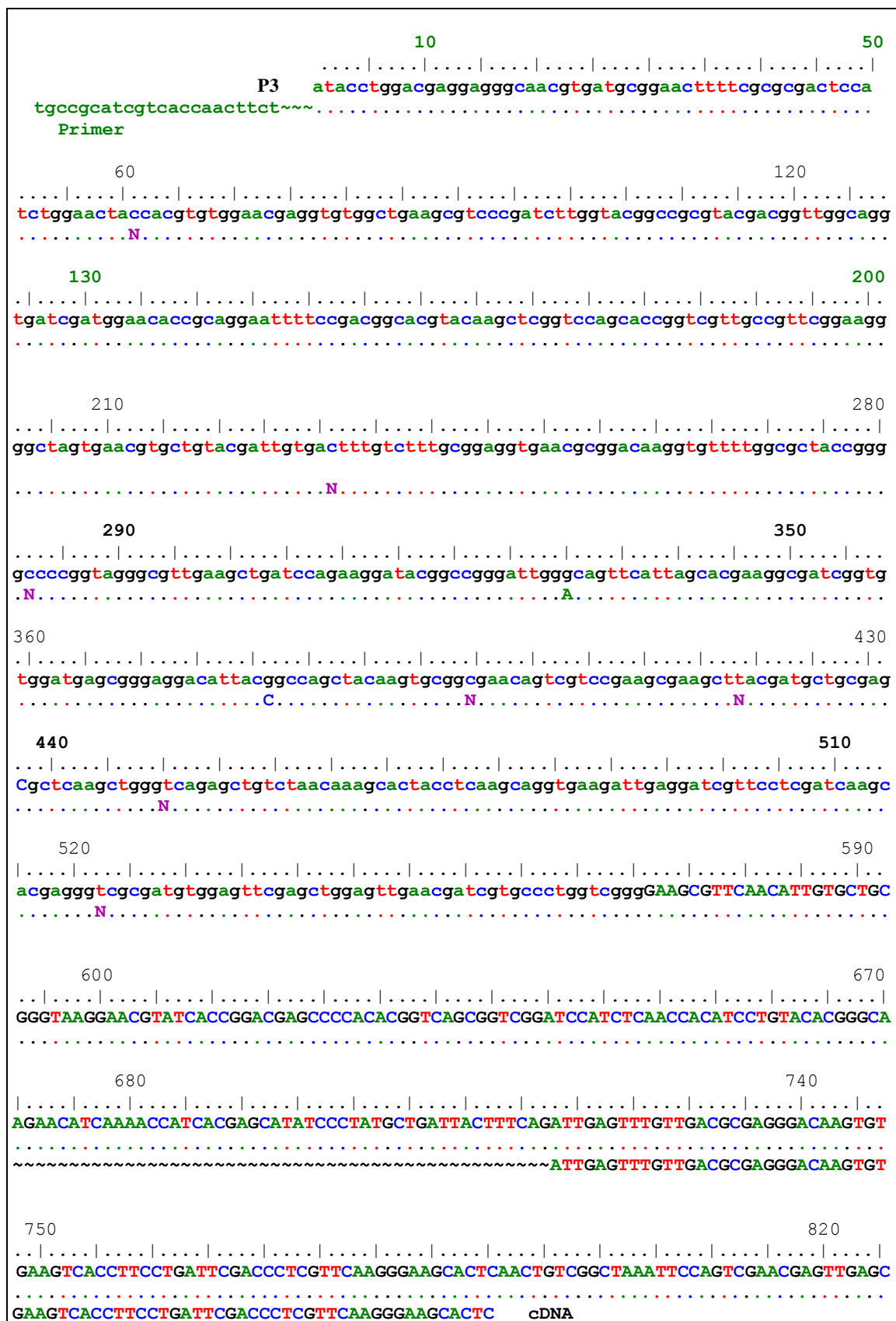
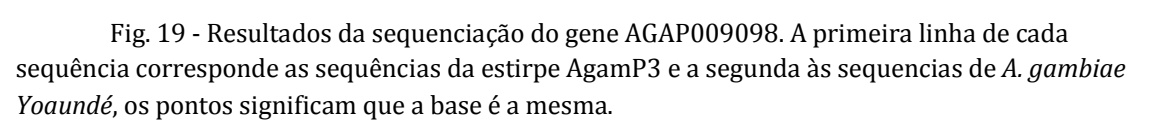


Fig. 18 - Resultados da sequenciação do gene AGAP009097. A primeira linha de cada sequência corresponde as sequências da estirpe AgamP3 e a segunda às sequencias de *A. gambiae* Yoaundé, os pontos significam que a base é a mesma.



VIII - Anexo II

Tabelas de análise estatística dos dados da inibição e silenciamento dos genes
AGAP009097 e AGAP009098

Tabela 6 – Efeito da inibição de Transglutaminase durante a infecção de *Plasmodium berghei* em *Anopheles stephensi*

	Número Médio de Oocistos	Escalas de Oocistos		Número de Mosquitos		Taxa de Infecção ¹ (%)	Incremento de infecção ² (%)	P ³	Incremento do nº de Oocistos ⁴	P ⁵
		Mínimo	Máximo	Infectados	Dissecados					
Exp 1										
D003	160	0	640	36	40	90,0	20,6	0,095	46,8	0,378
Controlo	109	0	340	20	28	71,4				
Exp 2										
D003	194	0	781	50	66	75,8	23,4	0,044	125,6	0,005
Controlo	86	0	648	29	50	58,0				
Exp 3										
D003	83	0	510	39	46	84,8	22,8	0,021	48,2	0,018
Controlo	56	0	475	33	52	63,5				
Total										
D003	151	0	781	125	152	82,2	22,2	0,000	93,6	0,000
Controlo	78	0	648	82	130	63,1				

1- $100 \times (\text{Número de mosquitos infectados} / \text{número de mosquitos dissecados})$; 2 - $100 \times [(\text{taxa de infecção grupo controlo} - \text{taxa de infecção D003}) / \text{taxa de infecção grupo controlo}]$; 3- Teste Fisher de comparação entre a taxa de infecção do grupo controlo e mosquitos tratados com D003; 4- $100 \times [(\text{número máximo de oocistos do grupo controlo} - \text{número máximo de oocistos do grupo tratado com D003}) / \text{número máximo de oocistos do grupo controlo}]$; 5 - Teste Mann-Whitney U comparando o número de oocistos entre o grupo controlo e mosquitos tratados com D003.

Tabela 7 – Efeito do silenciamento de Transglutaminase durante a infecção de *Plasmodium berghei* em *Anopheles gambiae*

	Número Médio de Oocistos	Escalas de Oocistos		Número de Mosquitos		Taxa de Infecção ¹ (%)	Incremento de infecção ² (%)	P ³	Incremento do nº de Oocistos ⁴	P ⁵
		Mínimo	Máximo	Infectados	Dissecados					
Exp 1										
Controlo	63	0	211	29	46	63,0				
dsRNA97	105	0	314	32	40	80,0	26,9	0,034	66,7	0,100
dsRNA98	112	0	457	33	42	78,6	24,6	0,032	77,8	0,160
Exp 2										
Controlo	64	0	207	17	26	65,4				
dsRNA97	123	0	375	30	38	78,9	24,3	0,015	92,2	0,260
dsRNA98	109	0	316	18	24	75,0	14,7	0,018	70,3	0,545
Total										
Controlo	63	0	211	46	72	63,9				
dsRNA97	113	0	375	61	77	79,2	24,0	0,001	79,4	0,028
dsRNA98	112	0	457	71	86	82,6	29,2	0,000	77,8	0,096

1- $100 \times (\text{Número de mosquitos infectados} / \text{número de mosquitos dissecados})$; 2 - $100 \times [(\text{taxa de infecção grupo controlo} - \text{taxa Infecção grupo experimental}) / \text{taxa de infecção grupo controlo}]$; 3-Teste Fisher de comparação entre a taxa de infecção do grupo controlo e mosquitos do grupo experimental; 4- $100 \times [(\text{número máximo de oocistos do grupo controlo} - \text{número máximo de oocistos do grupo experimental}) / \text{número máximo de oocistos do grupo controlo}]$; 5 - Teste Mann-Whitney U comparando o número de oocistos entre o grupo controlo e mosquitos tratados com D003.